

DÉTERMINATION DE LA CIBLE MOLÉCULAIRE ET DU MODE D'ACTION DE
LA TOMATIDINE ET DÉRIVÉS

Par

Maxime Lamontagne Boulet

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2017

Le 22 mai 2017

*Le jury a accepté le mémoire de Maxime Lamontagne Boulet
dans sa version finale*

Membres du jury

Professeur François Malouin

Directeur de recherche

Département de biologie

Professeur Vincent Burrus

Évaluateur interne

Département de biologie

Professeure Pascale Beauregard

Président-rapporteur

Département de biologie

SOMMAIRE

Il a été démontré dans le laboratoire du professeur François Malouin que la tomatidine possède une activité prometteuse et sélective contre les SCV de *Bacillales* (incluant *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Listeria*), mais pas contre les souches prototypes. En collaboration avec le laboratoire professeur Éric Marsault, un dérivé de la tomatidine (FC04-100) a été identifié avec une activité similaire à la tomatidine, en plus de posséder une activité contre les souches prototypes. Dans le but de confirmer la cible de la tomatidine et dérivés (p.ex. FC04-100), nous avons forcé l'apparition d'isolats résistants chez *Staphylococcus aureus* « small-colony variant » (SCV) par pression sélective (passage en série) de la tomatidine. La pression sélective de la tomatidine a mené à deux niveaux de résistance soit un faible et un élevé. Le séquençage génomique de ces isolats a permis d'identifier une mutation dans le gène *ccpA* (catabolite carbon protein A), associé au faible niveau de résistance, et une mutation dans le gène *atpE* (sous-unité c de l'ATP synthétase), associé au haut niveau de résistance. L'obtention de mutants supplémentaires par pression sélective à la tomatidine et de son dérivé aminé remplaçant l'hydroxyle de la position 3, FC04-100, a permis d'obtenir de nouveaux résidus mutés dans la sous-unité c de l'ATP synthétase. Chaque mutation dans la sous-unité c mène au même profil de résistance face à la tomatidine et FC04-100, indiquant effectivement une cible commune pour ces composés soit l'ATP synthétase bactérienne. Aucune mutation n'est retrouvée dans le gène *ccpA* pour les isolats sélectionnés en présence de FC04-100, consistant avec l'obtention d'un seul niveau de résistance causé par la mutation dans le gène *atpE*. De plus, le niveau de résistance est beaucoup plus faible pour FC04-100 que pour la tomatidine, indiquant une meilleure efficacité du dérivé. Le processus a également été répété pour une souche prototype de *S. aureus* par pression sélective de FC04-100, mais aucun isolat n'a été obtenu. La sous-unité c de l'ATP synthétase présente des séquences conservées au travers des espèces de *Bacillales* étant absente chez les espèces non cibles, ce qui peut expliquer en partie la sélectivité de la tomatidine pour ces espèces. Des tests préliminaires d'inhibition de l'ATP synthétase sur des vésicules membranaires inversées de *S. aureus* SCV (sensible à la tomatidine) ont montré dans un premier temps que celui-ci est apte à

produire de l'ATP via sa chaîne respiratoire malgré les altérations causant son phénotype SCV. Dans un second temps, la tomatidine et FC04-100 inhibent la production d'ATP de façon dose dépendante, pouvant être comparable à l'inhibiteur non spécifique DCCD. En se basant sur l'inhibiteur de l'ATP synthétase mycobactérienne, bédaquiline, la tomatidine et dérivés pourraient avoir un mode d'action similaire.

Mots clés : *Staphylococcus aureus*, SCV, tomatidine, ATP synthétase, résistance

REMERCIEMENTS

Dans un premier temps, j'aimerais remercier mon directeur de recherche, Pr François Malouin, pour les nombreuses années où il m'a permis de travailler dans son équipe. Je suis très reconnaissant du travail effectué pour son laboratoire, pour les nombreuses discussions constructives que nous avons eues ainsi que l'opportunité d'aller présenter le projet à un congrès (ECCMID) au Danemark en 2015.

Par la suite, je voudrais remercier mes conseillers Sébastien Rodrigue et Pierre-Étienne Jacques pour leurs nombreux conseils, support technique et la disponibilité qu'ils ont eu tout au long du projet. J'aimerais aussi remercier Kamal Bouarab, Ryzsard Brzezinski et Éric Marsault pour leur implication dans le projet, support technique et disponibilité pour répondre à mes questions.

J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire de François Malouin pour toute l'aide apportée et pour tous les beaux moments partagés. Un merci particulier à Céline Ster pour tout le support et aide apporté durant ma maîtrise, à Jean-Philippe Langlois qui va continuer la partie mutagenèse et Charles Isabel qui va continuer la partie biochimique. Un merci également à Pierre-Luc Boudreault et Marie-Claude Tremblay du laboratoire d'Éric Marsault pour le support technique au projet, vos conseils et pour le temps que vous avez pris pour moi.

Finalement, j'aimerais remercier l'Université de Sherbrooke et le Centre d'Étude et de la Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM) ainsi que le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et Génie (CRSNG) pour la bourse d'études supérieures du Canada (BESC M) Alexander-Graham Bell et le Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQ-NT) pour la bourse d'étude de cycles supérieurs en recherche.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	1
1.1.1 Généralités et importance clinique	1
1.1.2 Phénotype « small-colony variant »	2
1.2 Réseau régulateur global	4
1.2.1 Vue d'ensemble des facteurs régulateurs de la virulence chez <i>S. aureus</i>	4
1.2.2 « Accessory gene regulator » (Agr) : système <i>agr</i>	5
1.2.3 « Staphylococcal accessory regulator » (SarA).....	6
1.2.4 Facteur alternatif sigma B (SigB ou σ^B)	6
1.2.5 Autres.....	7
1.2.6 « Catabolite carbon protein A » (CcpA).....	8
1.2.6.1 Contrôle catabolique du carbone (CCC).....	8
1.2.6.2 Description générale de CcpA	9
1.2.6.3 Régulation du métabolisme par CcpA	11
1.2.6.4 Régulation de la virulence par CcpA	15
1.3 ATP synthétase bactérienne	18
1.3.1 Portrait général de l'ATP synthétase	18
1.3.2 Vue d'ensemble de la structure F_0F_1	19
1.3.3 Cheminement de protons au travers de F_0 jusqu'à la rotation catalytique	22
1.3.4 Vue d'ensemble du mode d'action de la Bédaquiline	26
1.4 Tomatidine et dérivés	31
CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE	34
ABSTRACT	37
INTRODUCTION.....	38
METHODS.....	41
RESULTS.....	44
DISCUSSION	55
AKNOWLEDGEMENTS	58
FUNDING	58
TRANSPARENCY DECLARATIONS	58

REFERENCES.....	58
CHAPITRE 3 : CONFIRMER LA CIBLE DE LA TOMATIDINE ET DÉRIVÉS	98
3.1 Mutagenèse : association entre les mutations dans <i>atpE</i> et la résistance	98
3.1.1 Complémentation du gène <i>atpE</i> chez <i>S. aureus</i> SCV	98
3.1.1.1 Préparation des plasmides.....	98
3.1.1.2 Transformation du SCV	100
3.1.1.3 Tests de CMI.....	101
3.1.2 Remplacement allélique du gène <i>atpE</i> chez <i>B. subtilis</i>	102
3.1.2.1 Préparations des plasmides	102
3.1.2.2 Transformation de <i>B. subtilis</i>	104
3.1.2.3 Délétion du gène <i>hemB</i>	105
3.1.2.4 Tests de CMI.....	106
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	108
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	114
BIBLIOGRAPHIE	116

LISTE DES ABRÉVIATIONS

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
SCV : « small-colony variant »
Agr : « Accessory gene regulator »
AIP : peptide autoinducteur
SarA : « Staphylococcal accessory regulator A »
SigB : Facteur alternative sigma B
ccpA : « catabolite carbon protein A »
CCC : contrôle catabolique du carbone
RCC : répression catabolique du carbone
ACC : activation catabolique du carbone
cre : « catabolite-responsive element »
PTS : système de phosphotransférase du transport de sucres
TCA : tricarboxylique
ATP : adénosine triphosphate
HTM : hélice transmembranaire
FPM : force proton motrice
 ΔpH : gradient de protons
 $\Delta \psi$: potentiel membranaire
ROS : « reactive oxygen species »
CMI : concentration minimale inhibitrice
TO : tomatidine
FcM : FC-majeur, stéréoisomère majeur de FC04-100
Fcm : FC-mineur, stéréoisomère mineur de FC04-100
Gen : gentamicine
mls : macrolides-lincosamides-streptogramines
VMI : vésicules membranaires inversées

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Tableau 1.	Caractéristiques génotypiques et phénotypiques des mutants résistants à la bédaquiline obtenus à partir de souches de référence (<i>M. tuberculosis</i> H37Rv et <i>M. smegmatis</i> mc2155) et de souches cliniques.....	28
------------	--	----

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Tableau 1.	Susceptibility profile of resistant SCV strains selected after serial passages in presence of tomatidine	46
Tableau 2.	Susceptibility profile of resistant SCV strains selected after serial passages in presence of FC04-100	46

CHAPITRE 3 : CONFIRMER LA CIBLE DE LA TOMATIDINE ET DÉRIVÉS

Tableau 1.	Susceptibilité à la tomatidine, FC04-100 et à la gentamicine pour <i>S. aureus</i> SCV exprimant la sous-unité c de type sauvage ou mutante (S26L).....	101
Tableau 2.	Listes des amorces pour répliquer le plasmide pMiniMad2-BsatpE avec le kit de mutagenèse dirigée de Agilent.....	104

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.	Système <i>agr</i> chez <i>S. aureus</i>	7
Figure 2.	Le portrait général du mécanisme moléculaire de la ACC/RCC chez <i>B. subtilis</i>	10
Figure 3.	Le portrait général de la régulation de <i>ccpA</i> au niveau du métabolisme, basé chez <i>B. subtilis</i>	15
Figure 4.	Modèle de l'ATP synthétase.....	19
Figure 5.	Structures cristallographiques présentant les sites de liaisons pour les protons H ⁺ /Na ⁺	25
Figure 6.	Modèle de liaisons optimales entre la bédaquiline et la sous-unité c de <i>M. tuberculosis</i>	29
Figure 7.	Structures de la tomatidine (A) et du dérivé FC04-100 (B)	33

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Figure 1.	Structure of Tomatidine and FC04-100.....	41
Figure 2.	Nucleic acid sequence alignments of the <i>ccpA</i> and <i>atpE</i> genes of <i>S. aureus</i> SCV resistant mutants.....	49

Figure 3.	Amino acid sequence alignments of the catabolite control protein A (CcpA) for <i>S. aureus</i> SCV resistant mutants selected after 30 passages with tomatidine or FC04-100	49
Figure 4.	Amino acid sequence alignments of the ATP synthase subunit C for <i>S. aureus</i> SCV resistant mutants selected after 30 passages with tomatidine or FC04-100.....	49
Figure 5.	Amino acid sequence alignments of the ATP synthase subunit C for selected species	52
Figure 6.	The ATP synthase subunit C models and multimeric models (build on homology with PDB 3ZO6 and PDB 1WU0 using 3D-Jigsaw server)	54

CHAPITRE 3 : CONFIRMER LA CIBLE DE LA TOMATIDINE ET DÉRIVÉS

Figure 1.	Schématisation des plasmides utilisés pour la surexpression du gène <i>atpE</i> chez <i>S. aureus</i> SCV.....	100
Figure 2.	Schématisation des cassettes contenues dans le plasmide pMinimad2.....	103

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Figure 1.	Tests d'inhibition de l'ATP synthétase dans des vésicules membranaires inversées de <i>S. aureus</i> SCV.....	111
-----------	---	-----

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 *Staphylococcus aureus*

1.1.1 Généralités et importance clinique

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram positive à faible contenu en bases G+C et anaérobie facultative, appartenant à l'ordre des *Bacillales* (*Staphylococcus*, *Bacillus* et *Listeria*). C'est un pathogène opportuniste important pouvant infecter différents hôtes dans plusieurs sites d'infections. Il possède de nombreux facteurs de virulence causant une variété d'infections passant par des cellulites, des mammites, des infections plus contagieuses comme l'impétigo, des infections à danger immédiat comme le choc toxique et des infections chroniques ou persistantes (fibrose kystique, ostéomyélite...). *S. aureus* représente l'une des causes majeures d'infections nosocomiales. De plus environ 20% des gens en santé seraient porteurs et environ 30% seraient porteurs de façon intermittente. Une variété de mécanismes régulateurs permet au pathogène de s'adapter aux différents microenvironnements, notamment via la production de nombreux facteurs de virulence (adhésines, capsule, enzymes de dégradation, toxines, immunomodulateurs...), la production de biofilm, la résistance aux antibiotiques (par mutation ou par acquisition) et l'adaptation vers un phénotype « small-colony variant » (SCV) (Archer 1998; Casey, Lambert, and Elliott 2007; Goerke and Wolz 2004; O'Riordan and Lee 2004; Stanley et al. 2003; Donlan and Costerton 2002; Garzoni and Kelley 2009; Proctor et al. 2006a). De plus, *S. aureus* produit certaines toxines associées avec l'empoisonnement alimentaire (Crago et al. 2012; Tassew et al. 2010).

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur en clinique humaine et vétérinaire, principalement dû au manque de nouvelles options thérapeutiques contre les pathogènes, ceux-ci développant des mécanismes de résistance efficaces (Talbot et al. 2006; Woodford and Ellington 2007; Ferri et al. 2015). *S. aureus* est un pathogène fréquemment réfractaire aux traitements d'antibiotique notamment via l'acquisition du gène *mecA* (penicillin-binding protein), lui conférant de la résistance aux antibiotiques β -lactames.

Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM) est de plus en plus prévalent, étant une cause majeure d'infections nosocomiales associées à des infections difficiles à traiter (SARM acquis en hôpital) et peut être acquis dans la communauté. En plus d'être résistant aux β -lactames, les SARM sont souvent résistants à de nombreuses autres classes d'antibiotiques comme les macrolides, les lincosamides, les aminoglycosides et les fluoroquinolones. De plus, de la résistance à la vancomycine, l'un des antibiotiques de dernier recours, commence à émerger chez *S. aureus* (Archer 1998; Gordon and Lowy 2008). L'émergence des SARM se retrouve également chez les animaux de compagnies et de bétails, la transmission de l'animal à l'homme a d'ailleurs été rapportée (Leonard and Markey 2008; García-Álvarez et al. 2011).

1.1.2 Phénotype « small-colony variant »

Les SCV chez les bactéries auraient été observées pour la première fois en 1910 en tant que forme atypique de *Salmonella enterica* serovar Typhi. Depuis, les SCV ont été observées chez de nombreuses espèces comme *S. aureus*, SARM, plusieurs staphylocoques à coagulase négative, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* et plusieurs autres (Sabra, Haddad, and Zeng 2014; Santos and Hirshfield 2016; Frenzel et al. 2015; Curtis, Gram, and Knudsen 2016; Proctor et al. 2006a). Ces deux dernières décennies, l'étude des SCV s'est principalement faite chez *S. aureus*, ceux-ci étant souvent associés à des infections persistantes difficiles à traiter (Proctor et al. 2006a). Parmi les infections chroniques ou persistantes, on retrouve des cas d'infections pulmonaires chez les patients atteints de fibrose kystique, d'ostéomyélite, d'arthrite septique et d'infections de prothèse orthopédique (Wolter et al. 2013; Kahl et al. 2003; Proctor et al. 2006a). Des cas ont également été rapportés en médecine vétérinaire, dont la mammite bovine, et dans la nourriture (Atalla et al. 2008; Onyango et al. 2012). Parmi les caractéristiques ayant menées à l'identification de SCV, on retrouve une croissance plus lente (observée par la formation de petites colonies), susceptibilité réduite à certains antibiotiques, absence de production de pigment et d'hémolyse (Proctor et al. 2006a).

De nombreuses altérations métaboliques peuvent mener à une croissance plus lente. Par contre, un nombre limité d'altérations est retrouvé chez les SCV cliniques. Deux groupes majeurs sont constamment isolés : les SCV déficients dans la chaîne de transport des électrons et les SCV déficients dans la synthèse de thymidine. À cela s'ajoute les SCV auxotrophe pour le CO₂, stimulant non spécifique pour la croissance de *S. aureus*, et les SCV n'ayant pas d'auxotrophie déterminée (Proctor et al. 2006a; Kahl 2014; Gómez-González et al. 2010). Les SCV déficients dans la chaîne de transport des électrons sont défectueux dans leur synthèse de ménadione et/ou d'hémine, deux composantes du système de transport des électrons, affectant ainsi la force proton motrice et le métabolisme oxydatif. Ces SCV présentent une diminution de la respiration, une diminution de l'activité hémolytique ainsi que de la coagulase et une susceptibilité réduite aux aminoglycosides. Leur phénotype peut être supprimé par l'ajout d'hémine et/ou de ménadione. La susceptibilité réduite aux aminoglycosides est due à la plus faible force proton motrice, puisque les aminoglycosides nécessitent un flux de protons actif pour bien passer la membrane. Les SCV déficients dans la synthèse de thymidine sont souvent isolés suivant un traitement à la triméthoprimé sulphaméthoxazole et possèdent des caractéristiques similaires aux déficients dans la chaîne de transport des électrons (Proctor et al. 2006a). De nombreuses conditions pouvant induire le phénotype SCV ont été rapportées comme le 4-hydroxy-2-heptylquinoline N-oxide produit par *Pseudomonas aeruginosa*, l'environnement interne de cellules eucaryotes, différentes classes d'antibiotiques, le stress par le froid et par haute pression hydrostatique (Mitchell, Séguin, et al. 2010; Kahl 2014). Plusieurs mécanismes moléculaires (autre que des mutations dans les gènes de synthèse d'hémine, de ménadione ou de thymidine) causant le phénotype SCV *in vitro* sont également rapportés comme des mutations dans *fusA* (translocase ribosomal), *rplF* (facteur d'élongation du ribosome), *relA* (hydrolase impliquée dans la réponse au stress) et *cspB* (protéine du choc du froid) (Kahl 2014).

Plusieurs mutations génétiques peuvent mener au phénotype SCV déficient dans la chaîne de transport des électrons. Notamment on retrouve le gène *menD*, impliqué dans la synthèse de ménaquinone, le gène *hemB*, impliqué dans la synthèse d'hémine, et le gène *ctaA*, impliqué dans la synthèse de l'hème A. Le ménaquinone et l'hème, synthétisé à partir

d'hémine, sont des composantes importantes de la chaîne de transport des électrons. Le gène *thyA*, codant pour la thymidylate synthétase, est généralement retrouvé chez les déficients dans la synthèse de thymidine, par contre le mécanisme moléculaire n'est pas bien compris encore (Proctor et al. 2006a; Kahl 2014). L'identification précise des altérations génétiques chez les isolats cliniques peut être compliquée, puisque les SCV cliniques sont aptes à retourner vers le phénotype normal et vice versa, pouvant mener à une diversité phénotypique dans une population (Tuchscherr et al. 2011). De plus, des mécanismes de « flip-flop » dans le génome (réversion de séquences d'ADN) de *S. aureus* ont été rapportés comme menant à la formation de SCV (Cui et al. 2012). La réversion de ces isolats en présence de certains composés (comme le ménadione, l'hémine et la thymidine) ont permis d'identifier leur déficience. L'étude de SCV de laboratoire stable, tel que la délétion du gène *hemB*, a permis d'identifier plusieurs caractéristiques majeures. Notamment, l'expression du cycle tricarboxylique et le système *agr* sont réprimés, alors que les gènes dépendant du régulateur SigB sont augmentés, ce régulateur jouant un rôle important chez le SCV (Seggewiss et al. 2006; Kriegeskorte et al. 2014; Mitchell et al. 2008; Mitchell et al. 2013; Brouillette et al. 2004; Moisan et al. 2006). Ainsi les SCV ont une expression d'adhésines qui est augmentée et une expression pour des exoprotéines (comme l'hémolysine) qui est diminuée. Le résultat est une meilleure capacité à adhérer aux composantes de l'hôte, à former du biofilm et serait lié à l'habileté d'invasion ainsi que de persistance dans les cellules de l'hôte (Mitchell et al. 2008; Mitchell, Brouillette, et al. 2010; Mitchell, Séguin, et al. 2010; R. Singh et al. 2009).

1.2 Réseau régulateur global

1.2.1 Vue d'ensemble des facteurs régulateurs de la virulence chez *S. aureus*

Toutes les bactéries requièrent du carbone et de l'énergie pour la croissance et la réplication. Chez les bactéries pathogènes, une partie du carbone et de l'énergie est dérivée des cellules de l'hôte. Ceci est accompli en partie par la synthèse de divers facteurs de virulence étant eux-mêmes régulés par différents réseaux de régulation complexes. Le « quorum sensing », via le système *agr*, joue un rôle central dans la régulation de la

pathogénèse de *S. aureus* en modulant l'expression de gènes en fonction de son stade de croissance. Par contre ce système est grandement dépendant des conditions environnementales, notamment puisque la croissance de la souche est influencée par la disponibilité des nutriments. Ainsi l'expression de facteurs de virulence est étroitement liée à la croissance de la souche et à différents signaux environnementaux. De plus, le système de « quorum sensing » est contrôlé par des régulateurs additionnels, répondant à des signaux autres que la densité de population. Donc une expression différentielle des gènes est obtenue par plusieurs régulateurs globaux formant ainsi un réseau complexe, étant étroitement lié à l'environnement de la bactérie (Goerke and Wolz 2004; Novick 2003; Novick and Geisinger 2008; Yarwood and Schlievert 2003; Somerville and Proctor 2009).

1.2.2 « Accessory gene regulator » (Agr) : système *agr*

Le système *agr* consiste en un système à deux composantes mesurant la densité de population et un ARN régulateur (RNAIII). Le tout est codé en deux régions sous le contrôle de deux promoteurs (P2 et P3). Le promoteur P2 contrôle quatre gènes : *agrA*, *agrC*, *agrD* et *agrB*. Le système à deux composantes comprend le récepteur AgrC, histidine kinase transmembranaire, et AgrA, le régulateur de réponse. AgrD code pour un petit peptide qui va subir des modifications via AgrB en peptide thiolactone cyclique, connu sous le nom de peptide autoinducteur (AIP). AgrC reconnaît l'AIP et module l'activité de AgrA, via le transfert de groupement phosphate. AgrA va ensuite activer et augmenter l'expression du promoteur P2 et P3, créant ainsi un cycle qui s'amplifie de plus en plus avec l'augmentation de la population. L'augmentation de la transcription de P3 mène à une augmentation de la quantité de RNAIII, comprenant entre autre le gène *hld* qui code pour l'hémolysine δ , voir la figure 1. RNAIII agit en tant qu'ARN régulateur qui augmente l'expression de plusieurs facteurs de virulence (comme des toxines, d'autres hémolysines et des protéases) et réprime l'expression de plusieurs protéines de surface (adhésines). Par contre différents facteurs de virulence ne sont pas régulés par le système *agr* ou ne le sont que partiellement. Ainsi, bien que la densité de population est critique pour la régulation de facteurs de virulence, d'autres systèmes additionnels sont présents (Yarwood and Schlievert 2003; Novick 2003; Novick and Geisinger 2008).

1.2.3 « Staphylococcal accessory regulator » (SarA)

SarA est le second système régulateur important chez *S. aureus*. Son expression est sous le contrôle de trois promoteurs présents sur le même locus. Le promoteur P1 et P2 requiert le facteur de transcription σ^{70} et le promoteur P3 requiert σ^B , suggérant que le gène peut être activé via différents stimuli. D'une part, SarA régule la transcription de *agrACBD* et de *RNAIII*, menant à une forte expression du système *agr*. Il a été montré que SarA contrôle une variété de facteurs de virulence, parfois de façon indépendante du système *agr*. Notamment, l'inactivation de *sarA* mène à une augmentation de l'expression du gène *spa* (protéine A) et une diminution pour *hla* (hémolysine α) (Yarwood and Schlievert 2003; Novick and Geisinger 2008; Somerville and Proctor 2009).

1.2.4 Facteur alternatif sigma B (SigB ou σ^B)

SigB est un facteur de transcription alternatif à l'ARN polymérase, le facteur principal pour la plupart des gènes étant σ^{70} . SigB est activé sous différentes conditions de stress (comme la chaleur et la pression osmotique), lors de transition de phase de croissance et durant des changements morphologiques (étant un régulateur important chez *S. aureus* SCV). L'activation de SigB, similaire à celle chez *B. subtilis*, implique un facteur anti-sigma (RsbW) et un facteur anti-anti-sigma (RsbV). En absence de stimuli environnemental, RsbW est lié à SigB et en présence de stimuli il y aurait activation de la phosphatase RsbU, celle-ci venant déphosphoryler RsbV. Sous cette forme, RsbV se lie avec RsbW de manière à augmenter la concentration de SigB libre. Ainsi, SigB se lie davantage à l'ARN polymérase menant à l'expression de gènes dépendants du contrôle de ce dernier. Notamment, il est observé que l'expression de plusieurs protéines de surface est augmentée alors que celle de plusieurs toxines est réprimée (Mitchell, Brouillette, et al. 2010; Novick 2003; Yarwood and Schlievert 2003; Somerville and Proctor 2009).

1.2.5 Autres

Au moins trois autres systèmes à deux composantes sont importants dans la régulation de la virulence chez *S. aureus*. SaeRS contrôle notamment la production de coagulase et d'hémolysine, mais ne possède pas d'effet sur RNAIII. ArlRS réprime la production d'hémolysine et d'exoenzymes et régule aussi l'activité autolytique ainsi que la pompe à efflux NorA. SrrAB inhibe la production de RNAIII et contrôle l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de l'énergie, permettant de faire un lien entre le « quorum sensing » et le métabolisme (Yarwood and Schlievert 2003; Novick 2003). Voir la figure 1 pour une vue d'ensemble des différents régulateurs.

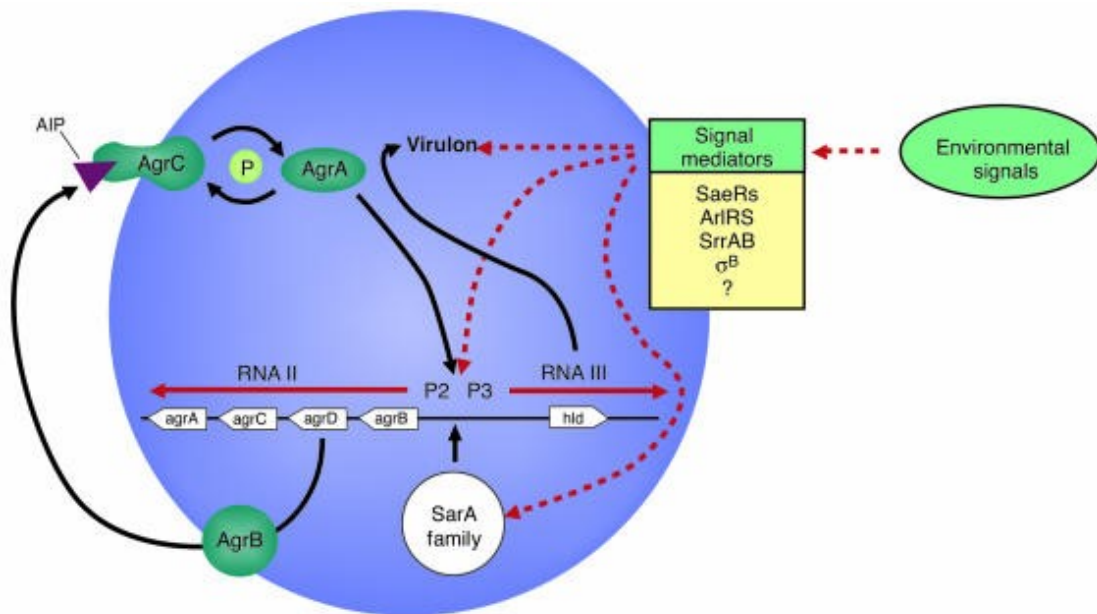


Figure 1. Système *agr* chez *S. aureus* (Yarwood and Schlievert 2003). Le promoteur P2 mène à l'expression des gènes impliqués dans le « quorum sensing » et le promoteur P3 vers l'expression de RNAIII. RNAIII stimule l'expression de P2 et P3 ainsi que divers facteurs de virulences en combinaison ou en compétition avec divers autres systèmes régulateurs.

1.2.6 « Catabolite carbon protein A » (CcpA)

1.2.6.1 Contrôle catabolique du carbone (CCC)

L'étude des bactéries cultivables en laboratoire se fait principalement dans des milieux de culture riches. Or, dans leur environnement naturel (chez un hôte par exemple), la plupart des nutriments sont présents en quantité limitée. De plus, la biodisponibilité d'eau et de ces nutriments est très variable ainsi que la composition des différents nutriments retrouvés. Ainsi, les bactéries ont développé des systèmes d'adaptation afin de tirer avantage de la grande diversité de source d'énergie et de leur disponibilité. Le contrôle catabolique du carbone (CCC) est un mécanisme général, retrouvé chez tous les microorganismes, permettant aux cellules de coordonner le métabolisme du carbone et des sources d'énergie afin de maximiser l'efficacité du catabolisme et de l'anabolisme ainsi que la régulation des autres processus métaboliques. Dans le CCC, on peut distinguer la répression catabolique du carbone (RCC) et l'activation catabolique du carbone (ACC). La RCC implique la répression de gènes et opérons impliqués dans le catabolisme et l'anabolisme en présence de sources de carbone et d'énergie préférentielle alors que l'ACC stimule l'expression de certains gènes ou opérons. L'effet final du CCC au travers des microorganismes est uniforme dans le sens où des gènes/opérons seront réprimés ou exprimés en fonction des sources de carbones et d'énergie disponibles, mais les mécanismes de régulation sont très variés (Saier 1991). Ainsi, les microorganismes peuvent s'adapter adéquatement en fonction des nutriments disponibles afin d'approvisionner les voies métaboliques centrales (telles que la glycolyse, la voie des pentoses-phosphate, le cycle tricarboxylique et le cycle 2-oxoglutarate-glutamine-glutamate) afin de synthétiser leurs composantes (acides nucléiques, sucres, protéines, lipides et paroi cellulaire) et de contrôler finement leur catabolisme. Typiquement, la présence de source d'énergie peut mener à l'activation/l'augmentation de l'expression d'inducteurs spécifiques, à la répression d'inducteur spécifique de voie alternative ou encore à l'altération de régulateurs spécifiques. Plus généralement, c'est l'activité de régulateurs globaux qui peut être altérée comme le récepteur à l'AMP cyclique chez les bactéries entériques (Saier et al. 1995) et le catabolite carbon protein A (CcpA) chez les Gram positifs à bas G + C (Henkin 1996).

1.2.6.2 Description générale de CcpA

Le « catabolite carbon protein A », membre de la famille des protéines régulatrices bactérienne LacI/GalR, est un régulateur clé de la RCC et est hautement conservé chez les Gram positif, ayant été intensivement étudié chez *B. subtilis*. CcpA induit ou réprime l'expression de gènes ou d'opérons, dont la majorité est impliquée dans l'acquisition et le métabolisme du carbone, par sa liaison à des séquences d'ADN nommées « catabolite-responsive elements » (cre). CcpA seul possède peu d'affinité pour les sites cre, il doit être en complexe avec un corégulateur afin d'avoir une haute affinité. En présence de glucose, ou autres sources de carbone rapidement métabolisables, le corégulateur HPr, protéine composante du système de phosphotransférase du transport de sucres (PTS), se complexe à ccpA suite à sa phosphorylation sur le résidu Ser46 par la kinase/phosphatase HPrKP (Fujita 2009; Sonenshein 2007; Moreno et al. 2001; Seidel et al. 2005; Tobisch et al. 1999; K. D. Singh et al. 2008). La RCC n'est pas directement induite par le glucose, ou autres source de carbone métabolisable, mais bien par les intermédiaires glycolytiques de ceux-ci, soit le glucose-6-phosphate et le fructose-1,6-bisphosphate (Lopez and Thoms 1977). Ces intermédiaires glycolytiques augmentent l'activité kinase de HPrKP et donc la phosphorylation du corégulateur HPr (J Deutscher, Saier, and Jr 1983). De plus, le glucose-6-phosphate et le fructose-1,6-bisphosphate peuvent se lier au complexe CcpA-HPr-Ser46-P augmentant ainsi son activité (Seidel et al. 2005; Schumacher et al. 2007). Chez *B. subtilis*, il existe une protéine paralogue à HPr, Crh, pouvant également se complexer avec ccpA pour l'activer (Josef Deutscher 2008), voir la figure 2. Cette protéine est cependant absente de chez *S. aureus* (Josef Deutscher, Francke, and Postma 2006). En plus de ces corégulateurs, il a été mis en évidence que ccpA interagit avec l'ARN polymérase et l'inhibe lors de la répression de certains gènes, processus stimulé par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP/NADPH) (J.-H. Kim, Yang, and Chambliss 2005). Ainsi, ces mécanismes de contrôle de ccpA permettent de réguler la transcription de gènes cibles en fonction du statut métabolique de la bactérie.

l'implication d'un second régulateur de la transcription, lui-même étant régulé par *ccpA*, ou encore un site de liaison à l'ADN par CcpA autre que les sites cre (Moreno et al. 2001). Des analyses structurales de CcpA ont également été réalisées afin de comprendre comment cette protéine peut réguler autant de gènes malgré un manque de conservation entre les séquences cre ainsi que l'absence de site cre pour certains gènes. CcpA est formé d'un dimère. Chaque dimère est caractérisé par la présence d'une séquence N-terminal d'environ 60 acides aminés qui forme le domaine de liaison à l'ADN (incluant les motifs « helix-turn-helix-loop-helix » et « hinge helice ») et d'une séquence C-terminal plus grande formant les sites de liaisons des effecteurs ainsi que de domaines d'oligomérisation. Son domaine de liaison à l'ADN ainsi que sa liaison aux différents effecteurs permettent à CcpA de se lier à l'ADN avec une grande flexibilité, c'est à dire en liant avec différents angles. L'abondance de résidus non polaires augmente également la possibilité d'interactions non spécifiques (Schumacher et al. 2007; Schumacher et al. 2011). Ainsi, CcpA est apte à se lier à l'ADN avec un haut degré de plasticité.

1.2.6.3 Régulation du métabolisme par CcpA

Les nombreuses études réalisées chez l'organisme modèle *B. subtilis* ont permis d'identifier le profil de RCC/ACC médié par CcpA, principalement en présence de glucose, mais aussi en absence de glucose. CcpA régule le métabolisme à de nombreux niveaux : catabolisme de sources de carbone secondaire et d'azote, l'anabolisme de métabolisme secondaire (comme des toxines), la glycolyse et le cycle tricarboxylique (TCA).

En présence de glucose, de nombreux gènes et opérons impliqués dans le catabolisme de sources secondaires et dans certains processus d'anabolisme secondaire (comme la synthèse d'enzymes extracellulaires) sont soumis à la RCC médiée par CcpA. Notamment, les gènes/opérons impliqués dans l'utilisation de xylose (*xylAB*), gluconate (*gntRKPZ*), galactose (*galKT*), glycérol (*glpFK*) et autres sont une cible directe de CcpA. Les gènes impliqués dans la dégradation de molécules complexes comme l'amidon (*amyE*), les polymères de fructose (*levDEFG-sacC*) et aussi les acides gras (certains gènes du régulon FadR) sont soumis à la RCC médiée par CcpA. Plusieurs acides aminés et nucléotides

peuvent également être utilisés comme source de carbone, ainsi certains gènes/opérons impliqués dans ces processus sont soumis également à la RCC par CcpA. Entre autres, il y a l'opéron *hutPHUIGM* (histidine), les opérons *dra-nupC-pdp* et *drm-pupG* (métabolisme des désoxyribonucléotides) et *sigL* (métabolisme de l'azote). Il y a également une forte synthèse des enzymes glycolytiques encodés par le gène *gap* et l'opéron *pgk*, catalysant la conversion de triose phosphate en phosphoénolpyruvate, alors que les autres enzymes sont exprimés de manière constitutive. L'activation de la glycolyse serait CcpA-dépendante, puisqu'il y a absence de ces transcrits chez les mutants *ccpA* en présence de glucose (Moreno et al. 2001; Fujita 2009; Sonenshein 2007; Somerville and Proctor 2009). Ainsi en milieux riches en glucose, il va avoir formation de l'ATP via la glycolyse et donc accumulation de pyruvate et de NADH.

Les destinées du pyruvate sont d'une grande importance pour la cellule puisqu'il peut entrer dans plusieurs voies métaboliques selon les besoins de la cellule en fonction de ses conditions de croissance. De façon générale chez *B. subtilis* et les staphylocoques, le pyruvate peut être converti principalement en lactate, en acétoïne et en acétate (le pyruvate doit être converti préalablement en acétyl-coA). En milieux riches en nutriments (avec glucose ou autres sources préférentielles), peu d'acétyl-coA entre dans le cycle TCA, il sera principalement transformé en acétate et excrété. Le pyruvate peut également entrer dans la formation du groupe d'acide aminé ramifié (chaîne latérale composée de groupe aliphatique ramifié ; acides aminés les plus abondants) servant de précurseurs pour les acides gras. Ces processus sont contrôlés de façon dépendante de CcpA. Les gènes *ackA* et *pta*, impliqués dans la formation d'acétate, sont positivement régulés par CcpA. Il en va de même pour l'opéron *ilv-leu*, impliqué dans synthèse des acides aminés ramifiés, et pour l'opéron *alsSD*, pour la formation d'acétoïne. Ainsi, l'ACC dépendante de CcpA de ces gènes permet de réduire l'accumulation de pyruvate résultant d'un milieu riche (Moreno et al. 2001; Fujita 2009; Sonenshein 2007; Somerville and Proctor 2009). La formation du lactate semble être dépendante du glucose seulement (Crooke et al. 2013).

En milieu riche, le cycle TCA tend à être inhibé et CcpA joue un rôle dans ce processus. La citrate synthétase (*citZ*), permettant la condensation de l'acétyl-coA avec l'oxaloacétate

en citrate, est directement inhibée par CcpA. De plus, *citZ* est en opéron avec *citC* (isocitrate déshydrogénase) et *citH* (malate déshydrogénase), par contre *citC* et *citH* possèdent chacun un promoteur spécifique, ainsi la répression de l'opéron *citZCH* est incomplète pour *citC* et *citH*. *CitB* (aconitase) est également réprimé, mais de manière indirecte par CcpA via le contrôle de la synthèse de citrate. Plusieurs transporteurs d'intermédiaires du cycle TCA sont également soumis à la RCC dépendante de CcpA. Notamment, l'opéron *citM-yfjN* impliqué dans le transport du citrate et son activateur, système à 2 composantes (CitS/CitT). L'activateur de *dctP* (transport du malate, fumarate et succinate) et le système à deux composantes (DctS/DctR) sont également réprimés par CcpA. En lien avec le cycle TCA, CcpA réprime également certains gènes/opérons impliqués dans la respiration cellulaire. L'opéron *resABCDE* (impliqué dans la synthèse du cytochrome c, transfert d'électron et autre processus en lien avec l'oxygène) est important pour la respiration et est sévèrement réprimé en présence de glucose directement par CcpA. De plus, *cccA* (code pour le cytochrome *c*₅₅₀) et l'opéron *cydABCD* (code pour le cytochrome bd oxydase) sont également directement soumis à la RCC par CcpA (Moreno et al. 2001; Fujita 2009; Sonenshein 2007; Somerville and Proctor 2009). Ainsi, en présence de glucose, la bactérie produit son ATP principalement via la glycolyse.

B. subtilis assimile l'ammonium principalement via la synthèse de glutamine et de glutamate (opéron *gltAB*). L'induction de cet opéron se fait via des intermédiaires glycolytiques, phénomène absent chez des mutants de délétion *ccpA*. Ainsi, CcpA régulerait indirectement ce processus. De plus, le gène *rocG* (glutamate déshydrogénase) est directement réprimé par CcpA (Moreno et al. 2001; Fujita 2009; Sonenshein 2007; Somerville and Proctor 2009).

Chez *S. aureus*, peu d'études ont été réalisées sur CcpA jusqu'à présent. Une étude principale a été menée sur le régulon de CcpA chez *S. aureus* par l'équipe de Seidl et al. et arrive à des résultats similaires sur la régulation centrale du métabolisme du carbone. Par contre, plusieurs différences substantielles ont été mises en évidence. Notamment, plusieurs gènes régulés de façon CcpA-dépendante chez *B. subtilis* ne le seraient pas chez *S. aureus*. Par exemple, les gènes *pta*, *ackA* et *alsD*, impliqués dans la synthèse d'acétate

et d'acétoïne. Il n'y aurait pas non plus de régulation dépendante de CcpA pour la synthèse du glutamate via l'opéron *gltBD*, par contre la synthèse de proline est réprimée chez *S. aureus* (ccpA réprime *rocF* et *rocD*), contrôlant indirectement la synthèse d'arginine (lié à la synthèse de la proline) (Li et al. 2010; Nuxoll et al. 2012). Autre différence marquante, est l'absence apparente d'induction de gènes liés à la synthèse d'acides aminés ramifiés. Par contre, les études de la régulation des gènes par CcpA ont été réalisées à différentes phases de croissance de *B. subtilis*. Or, l'étude principale à ce sujet menée sur *S. aureus* a été réalisée en début de phase de croissance, ainsi il est possible que de nombreux gènes sous le contrôle de CcpA n'aient pas encore été identifiés. Par contre, les gènes *pckA* (PEP carboxykinase impliqué dans la glucogenèse) et *AcsA* (acétyl-CoA-synthétase) sont régulés de façon dépendante par CcpA en présence de glucose pour *S. aureus* (Seidl et al. 2009). De plus, une étude récente a mis en évidence un mécanisme de régulation de CcpA via la sérine/thréonine kinase Stk1 chez *S. aureus*, mécanisme absent chez *B. subtilis* (Leiba et al. 2012). Le portrait général de la régulation par CcpA est illustré à la figure 3.

and Camilli 2005) et *Bacillus anthracis* (Chiang, Bongiorno, and Perego 2011). Notamment chez *S. aureus*, CcpA régule positivement le système *agr* via l'expression de RNAIII, système régulant de nombreux facteurs de virulence, et ce de manière assez prononcée puisqu'aucun transcrit de RNAIII n'est détectable chez des mutants de délétion de CcpA. Il affecterait également la transcription de *hla*, codant pour l' α -hémolysine, en considérant également que *hla* est régulé par le système *agr*. CcpA agit également sur un facteur immunomodulateur important de la virulence chez *S. aureus*, soit *spa*, protéine A permettant d'inhiber la phagocytose. Il y a répression dépendante de CcpA en présence de glucose du gène *spa*. D'autres protéines impliquées dans les processus immunomodulateurs sont aussi réprimées dépendamment de CcpA en présence de glucose. Par exemple, il y a les protéines IsaA (« immunodominant antigen A ») et SsaA (« staphylococcal secretory antigen A »). Des gènes impliqués dans le stimulon du stress de la paroi cellulaire sont quant à eux activés de façon dépendante par CcpA en présence de glucose, entre autres le système à deux composantes VraRS. L'expression du gène codant pour RsbW (facteur anti-sigma) est augmenté en présence du glucose dépendamment de CcpA (Seidl et al. 2006; Seidl et al. 2009).

La production d'une capsule polysaccharidique est un facteur de virulence important chez de nombreux Gram positifs. Sa production est contrôlée via de nombreux stimuli et régulateurs. Chez *S. aureus*, sa production serait principalement via l'opéron *cap*. Or, il est déjà connu que l'opéron *cap*, et donc la production de capsule, est réprimé en présence de glucose. Cette répression est dépendante de CcpA, car chez un mutant de délétion de *ccpA*, *cap* est transcrit en grande quantité et ce même en présence de glucose (Seidl et al. 2006; Seidl et al. 2009). Ce phénomène est observé chez de nombreux autres pathogènes à Gram positif tel que *Streptococcus pneumoniae* (Giammarinaro and Paton 2002) et *Clostridium perfringens* (J. Varga, Stirewalt, and Melville 2004).

Le biofilm, autre facteur important de la virulence, est également affecté chez *S. aureus* par CcpA. Notamment, il y a abolition de la formation du biofilm *in vitro* chez des mutants de délétion de *ccpA*. La formation du biofilm est un processus en plusieurs étapes, est régulé en plusieurs étapes et plusieurs composantes entre dans la formation du biofilm

(biofilm variable). Parmi les composantes importantes du biofilm de *S. aureus*, il y a les « polysaccharides intercellular adhesins » (PIA) encodées par l'opéron *icaADBC*, étant positivement régulé CcpA en présence de glucose. CcpA régule positivement également l'opéron *cidABC* en présence de glucose, dont principalement CidA étant impliqué dans le relâchement d'ADN extracellulaire dans le biofilm. Ainsi, CcpA régulerait positivement la formation de biofilm chez *S. aureus* (Seidl et al. 2008; Seidl et al. 2009), ce qui contraste avec les observations faites chez *B. subtilis* où CcpA réprimerait la formation de biofilm dépendamment des conditions (Stanley et al. 2003). Par contre la formation de biofilm chez *S. aureus* diffère grandement de celle chez *B. subtilis* (Chai et al. 2007). CcpA est impliqué aussi pour la formation du biofilm chez *C. perfringens* (J. J. Varga, Therit, and Melville 2008) et *S. mutans* (Ahn et al. 2010).

Autre effet majeur de CcpA au niveau des facteurs de virulence est sa régulation de la production de toxines. Chez *S. aureus*, CcpA réprime directement en présence de glucose la production de la toxine 1 du syndrome du choc toxique (TSST-1) via un site cre dans le promoteur de *tst* (Seidl, Bischoff, and Berger-Bächi 2008). Ce phénomène est observé pour plusieurs autres pathogènes à Gram positif tel que *C. difficile* (TcdA et TcdB) (Dupuy and Sonenshein 1998) et *B. anthracis* (via AtxA, un régulateur de ses toxines) (Chiang, Bongiorno, and Perego 2011). Dans le cas de *C. perfringens*, CcpA réprime en présence de glucose ses deux toxines responsables de la gangrène (phospholipase C et perfringolysine) (Méndez et al. 2012), mais active en présence de glucose l'expression de son entérotoxine responsable d'empoisonnement alimentaire (J. Varga, Stirewalt, and Melville 2004).

Finalement, il a été observé chez *S. aureus* que CcpA avait une implication au niveau de la susceptibilité aux antibiotiques. Notamment, un mutant de délétion *ccpA* possède une susceptibilité réduite à l'oxacilline et à la téicoplanine, observations faites chez un *S. aureus* résistant à la méthicilline et une souche résistante à la téicoplanine (Seidl et al. 2006). Une mutation dans le gène *ccpA*, en combinaison avec d'autres gènes mutés, ont été retrouvés chez un isolat de *S. aureus* avec une susceptibilité réduite pour le désinfectant à base d'huile de pin. L'effet de la mutation du gène a été peu exploré outre qu'elle permettrait un taux de croissance et utilisation plus rapide des différentes sources de

carbone ainsi qu'une diminution de la production de capsule (Lamichhane-Khadka et al. 2008).

1.3 ATP synthétase bactérienne

1.3.1 Portrait général de l'ATP synthétase

L'adénosine triphosphate (ATP), source d'énergie ubiquitaire chez les organismes vivants, est synthétisée à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (P_i) principalement par l'ATP synthétase (aussi appelé F-ATPase ou F_0F_1) retrouvé dans les membranes des bactéries, des mitochondries et des chloroplastes (Boyer 1997; John E. Walker 2013). L'ATP synthétase bactérienne est composé d'une partie soluble F_1 (partie extrinsèque de la membrane) constituée des sous-unités $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ et d'une partie ancrée dans la membrane F_0 constituée des sous-unités $a_1b_2c_n$ (Abrahams et al. 1994; Fillingame, Angevine, and Dmitriev 2003). Chez la mitochondrie, l'ATP synthétase contient plusieurs sous-unités périphériques supplémentaires aux huit sous-unités retrouvées chez les bactéries (John E. Walker 2013; Abrahams et al. 1994) (voir figure 4). La séquence des gènes constituant l'ATP synthétase a été déterminée pour une variété de bactéries, dont *E. coli* (J E Walker et al. 1984) et *Bacillus sp* (Ohta et al. 1988). L'opéron est arrangé sous forme *atpIBEFHAGDC* où *atpHAGDC* code respectivement pour les sous-unités δ , α , γ , β ainsi que ϵ du domaine F_1 et où *atpBEF* code respectivement pour les sous-unités a, c ainsi que b du domaine F_0 . Le gène *atpI* chez *E. coli* code pour une protéine inconnue dispensable pour l'ATP synthétase (von Meyenburg et al. 1982). L'enzyme utilise l'énergie électrochimique sous forme de gradient de protons (principalement des H^+ et aussi Na^+) (Mitchell 1961; Dimroth 1997) au travers de la membrane entraînant une rotation du moteur F_0 permettant la synthèse d'ATP dans le domaine F_1 (Sambongi et al. 1999; Diez et al. 2004). Sous certaines conditions, la réaction catalytique opposée peut se produire (hydrolyse d'ATP afin de maintenir/rétablir le gradient électrochimique). Par exemple chez *Listeria monocytogene*, l'ATP synthétase joue un rôle dans l'homéostasie du pH (Cotter, Gahan, and Hill 2000). Afin de prévenir des pertes d'ATP, les bactéries (Hyndman et al. 1994) et les mammifères (Drobinskaya et al. 1985) ont développé un mécanisme

d'inhibition commun, inhibition MgADP (Hirono-Hara et al. 2001), et des mécanismes distincts soit via la protéine IF₁ pour les mammifères (Cabezón et al. 2001) et via la sous-unité ϵ pour les bactéries (Feniouk et al. 2010).

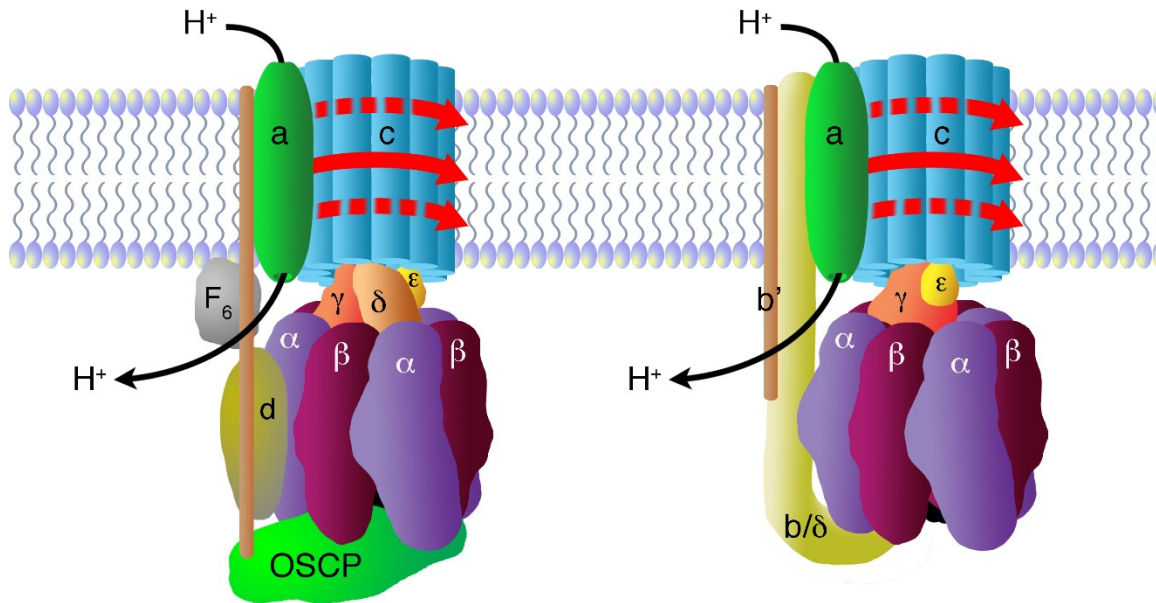


Figure 4. Modèle de l'ATP synthétase. Chez la mitochondrie (gauche) et la bactérie (droite). À noter, que le modèle de l'ATP synthétase bactérienne présentée ici est basé sur le modèle de *Mycobacterium* où la tige périphérique est atypique soit la fusion entre une sous-unité b et la sous-unité δ . Normalement chez les autres bactéries, on retrouve un dimère de b et l'une des sous-unités b est lié à δ , celui-ci lui l'hexamère (modèle réalisé par Benoît Leblanc de l'Université de Sherbrooke).

1.3.2 Vue d'ensemble de la structure F₀F₁

Le moteur F₁ consiste en un assemblage hexamérique alternant entre les trois paires de sous-unités $\alpha\beta$ autour d'une tige centrale, la sous-unité γ , en plus de la sous-unité ϵ (δ et ϵ chez la mitochondrie, δ étant homologue à la sous-unité bactérienne ϵ). La tige centrale γ , composé d'hélices α asymétriques, cause les conformations asymétriques de chaque paire de $\alpha\beta$ résultant d'interactions entre γ et β . Alors que les sous-unités α adoptent des

conformations similaires, les sous-unités β se retrouvent en trois conformations différentes représentant trois états de liaisons aux nucléotides. Ainsi suivant la rotation de γ , le site catalytique contenu dans chaque sous-unité β change de conformation adoptant ainsi différentes affinités pour la liaison aux nucléotides. Le corps du moteur F_1 est lié au moteur F_0 via une tige périphérique. Chez les bactéries, cette tige périphérique est constituée des sous-unités δ et b (OSCP, b , d et F_6 chez la mitochondrie). OSCP et δ sont homologues et adoptent une conformation similaire. La sous-unité δ lie la partie supérieure de l'assemblage $\alpha_3\beta_3$ et la sous-unité b via son domaine C-terminale (von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth 2009; Krah 2015; Nakanishi-Matsui, Sekiya, and Futai 2016). Chez *Mycobacterium*, la tige périphérique est constituée d'une fusion génétique entre l'une des deux sous-unités b et la sous-unité δ (Lu, Lill, and Bald 2014). La sous-unité b , hélices α assemblées en dimère, interagit avec la sous-unité a et l'anneau de sous-unités c (anneau- c). Ainsi, la tige périphérique (δ et b) permet de relier les moteurs F_0 et F_1 . La sous-unité ϵ , quant à elle, est composée de feuillets β rigides, liant la tige centrale γ et l'anneau- c , et d'une hélice α C-terminale s'insérant dans l'hexamère $\alpha_3\beta_3$ et liant l'ATP. Lorsque la concentration en ATP est faible, celle-ci se libère du domaine C-terminale de ϵ , entraînant un changement de conformation vers l'état inhibiteur, prévenant ainsi l'activité hydrolytique de l'ATP en ADP et P_i (von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth 2009; Krah 2015; Nakanishi-Matsui, Sekiya, and Futai 2016). L'affinité de l'ATP pour ϵ a été déterminée pour une variété d'espèces dont *B. subtilis* avec 2,3 mM (Kato-Yamada 2005) et 22 mM pour *E. coli* (Yagi et al. 2007). Ainsi la concentration d'ATP requise pour inhiber l'activité hydrolytique de l'ATP synthétase varie grandement au travers des espèces, ce qui suggère des besoins métaboliques très variés.

Le moteur F_0 consiste en un complexe protéique intégré dans la membrane composé d'un anneau- c (assemblage oligomérique de la sous-unité c) avec en périphérie la sous-unité a et le dimère de sous-unité b . Chaque sous-unité c consiste en deux hélices transmembranaires (HTM) connectées par une boucle hydrophobe (« loop ») formant ainsi une épingle. La HTM1 se retrouve vers l'intérieur de l'anneau- c et la HTM2 vers l'extérieur. La HTM2 porte le groupement carboxyle hautement conservé (Asp61 chez *E.*

coli, Glu61 chez *M. tuberculosis*, Glu54 chez *B. subtilis*, *Bacillus pseudofirmus* et *S. aureus*) essentiel pour le transfert de protons (H^+ et Na^+) (Stock, Leslie, and Walker 1999; Fillingame, Angevine, and Dmitriev 2003; von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth 2009). Des études structurales ont montré que la chaîne du carboxyle essentiel se retrouve « incluse » dans les sous-unités c avoisinantes où la chaîne sur le « devant » d'une sous-unité c se retrouve vers « l'arrière » de la sous-unité suivante. Il a été identifié chez *E. coli* que certains résidus seraient essentiels pour ces interactions (interactions entre les résidus de la HTM1 24 et 28 avec Asp61 de la HTM2; interactions entre les résidus 61 et 62 de la HTM2) (Fillingame, Angevine, and Dmitriev 2003). Les études ayant été principalement faites avec *E. coli*, *Ilyobacter tartaricus*, *Spirulina platensis* et *B. pseudofirmus* OF4 montrent une géométrie similaire pour le réseau de liaisons aux protons H^+ (Meier et al. 2009; Krah et al. 2010; Laura Preiss et al. 2010; Fillingame and Steed 2014). Les autres résidus environnant le réseau de liaisons forment des réseaux de ponts hydrogènes entre la HTM1 et 2 ainsi que la HTM2 de la sous-unité c suivante. Ainsi les sous-unités c forment une structure en forme d'anneau (ou de cloche selon l'espèce) dont la cavité intérieure est remplie de phospholipides de l'environnement naturel de la membrane (Oberfeld, Brunner, and Dimroth 2006). La stœchiométrie de l'anneau-c varie entre les espèces soit de 8 sous-unités chez la mitochondrie bovine (Watt et al. 2010), 10 sous-unités pour *E. coli* (Jiang, Hermolin, and Fillingame 2001) et *Bacillus* PS3 (Mitome et al. 2004), 11 sous-unités chez *I. tartaricus* (Meier et al. 2009), 13 sous-unités chez *B. pseudofirmus* OF4 (Laura Preiss et al. 2010) et des sous-unités de 13 à 15 chez différentes cyanobactéries (von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; Krah et al. 2010). Ces différentes stœchiométries affectent le ratio H^+ (ou Na^+)/ATP, où un anneau- c_{15} requiert le 2/3 de la force proton motrice (FPM) versus un anneau- c_{10} , ce qui pourrait refléter des adaptations aux différentes conditions environnementales, notamment la production d'ATP avec une FPM plus faible. De plus chez *I. tartaricus*, il a été montré par mutagenèse directe d'un motif glycine conservé (cG25-G33) dans la HTM1 que cela pouvait mener à des stœchiométries différentes (c_{12-13} au lieu de c_{11}) (Pogoryelov et al. 2012). La boucle hydrophobique reliant la HTM1 et 2 forme une région dans l'anneau-c permettant de lier la tige centrale γ et la sous-unité ϵ . La sous-unité a est une protéine très hydrophobique étant composée, dans la majorité des modèles, de cinq HTM où HTM2 à 5 forme un ensemble de 4 hélices. Cet ensemble de 4

hélices forme un demi-canal aqueux pour le transfert de protons à l'interface a/c. Les études démontrent que les HTM4 et 5 bougeraient de façon à faciliter le transfert de protons relatif entre a et c ainsi que le rôle critique de l'interaction entre Arg210 de la HTM4 de la sous-unité a et Asp61 de la HTM2 de la sous-unité c. Le tout est joint par les sous-unités b qui contactent la partie C-terminale des sous-unités c et la boucle entre les HTM 4 et 5 de la sous-unité a (von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth 2009; Girvin and Rastogi 1999; Fillingame and Steed 2014; Fillingame, Angevine, and Dmitriev 2003; Martin et al. 2015).

1.3.3 Cheminement de protons au travers de F_0 jusqu'à la rotation catalytique

Chez la plupart des organismes, l'énergie pour la synthèse d'ATP est fournie par la FPM (ou $\Delta\mu H^+$) étant la sommation du potentiel membranaire ($\Delta\psi$) et de la concentration du gradient de protons (ΔpH). Pour certains organismes, par exemple certaines bactéries anaérobies, la synthèse d'ATP est couplée à la translocalisation de protons Na^+ utilisant ainsi une force sodium motrice ($\Delta\psi + \Delta pNa$). Le potentiel membranaire et la concentration de gradient de protons sont des paramètres thermodynamiquement équivalents. Par contre plusieurs études montrent que ces paramètres ne sont pas cinétiquement équivalents, suggérant que chaque paramètre doit faire face à des barrières cinétiques différentes. Des études chez *Propionigenium modestum* et *I. tartaricus* ont montré leur synthèse d'ATP, dépendante de la translocation de Na^+ , requiert une force ion motrice d'au moins ~ 120 mV avec contribution égale du $\Delta\psi$ et du ΔpNa . Chez la mitochondrie bovine, ATP synthétase se servant de la translocalisation de H^+ , il faut un $\Delta\psi$ d'environ 120 mV ou un ΔpH d'environ 180 mV pour obtenir un bas niveau de synthèse d'ATP. La combinaison de ces deux paramètres augmente grandement le taux de synthèse. D'autres études chez *E. coli*, *Bacillus* PS3 et *Streptococcus lactis* montrent que pour eux une seule composante de la FPM est suffisante pour fournir l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP, à condition qu'elle soit appliquée à un haut niveau ($\Delta\psi > 180$ mV ou $\Delta pH > 280$ mM). Ainsi ces paramètres déterminent l'habileté de l'enzyme à utiliser ces forces énergétiques afin de les convertir en énergie torque pour ultimement mener à la rotation catalytique de la synthèse

d'ATP (von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth 2009).

La synthèse d'ATP implique que le moteur F_0 convertisse le gradient électrochimique de protons H^+ ou Na^+ en énergie torque (rotation) afin de forcer le moteur F_1 à entrer en rotation catalytique de synthèse d'ATP. Les modèles récents, principalement chez *E. coli*, proposent que les ions soient translocalisés via un « demi-canal » périplasmique (impliquant la sous-unité a) pour aller se lier et neutraliser les sites spécifiques de liaisons de ces ions sur l'anneau-c (rotor), impliquant entre autre un groupement carboxyle conservé. Suite à ces liaisons entraînant une conformation « ion lock », les ions entraînent leur mouvement au travers de l'environnement de chaînes alkyles de la membrane. Après une rotation de 360° par rapport au stator (ab_2), les ions peuvent être relâchés dans un second canal hydrophile au travers de la sous-unité a (créant ainsi un mouvement rotatoire et génération d'énergie torque). La translocalisation des ions de l'environnement externe jusqu'aux sites de liaison dans l'anneau-c implique le passage de ceux-ci au travers d'un canal hydrophile qui serait fourni par l'ensemble de 4 hélices (HTM2 à HTM5) de la sous-unité a. Une série de résidus polaires dans la sous-unité a pourrait fournir ce canal soit Gln 252, Asn214, Asn148, Asp119, His245, Glu219, Ser 144 et Asn238, où His245 et Glu219 sont critiques. Ainsi ce canal permettrait le chargement des ions jusqu'au résidu critique conservé, Arg210 (la charge du stator), contenu dans la HTM4 de la sous-unité a, menant à la protonation du groupement carboxyle conservé (glutamate ou aspartate). Cette protonation est facilitée par le mouvement relatif des HTM4 et 5 de la sous-unité a au site d'interaction avec cAsp61 (interface a/c) (von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth 2009; Fillingame and Steed 2014; Girvin and Rastogi 1999; Fillingame, Angevine, and Dmitriev 2003; Martin et al. 2015).

Plusieurs études ont tenté d'identifier le réseau de coordination de liaisons de ces protons (H^+ ou Na^+). Notamment, la spécificité de l'enzyme pour les H^+ serait une caractéristique commune pour toutes les ATP synthétases, due à la présence du groupement carboxyle conservé. La spécificité pour les H^+ serait grandement augmentée par la présence de résidus avec des chaînes hydrophobes dans les régions avoisinantes du groupement

carboxyle conservé. Le degré par lequel une ATP synthétase pourrait coordonner les ions Na^+ serait influencé par la présence d'un nombre suffisant de résidus permettant la liaison aux Na^+ et/ou molécules d'eau (Krah et al. 2010). Le réseau de coordination de liaisons des protons a été étudié entre autres chez *I. tartaricus* (Meier et al. 2009) qui possède une ATP synthétase utilisant les ions Na^+ . Le réseau de coordination est formé par l'atome d'oxygène contenu dans la chaîne latérale de Q32 et E65 d'une sous-unité C avec l'atome d'oxygène du groupement hydroxyle de S66 ainsi que l'atome d'oxygène du groupement carbonyle de V63, ces deux dernières étant dans la sous-unité c avoisinante. La résultante est un réseau de ponts hydrogènes permettant la coordination de protons Na^+ et évite la protonation de E65. Les études chez *S. platensis* (Krah et al. 2010), ATP synthétase couplée au transport de H^+ , révèle une géométrie similaire pour la liaison au H^+ (voir figure 5, modifiée de Lu *et al.* 2015). Sa plus grande spécificité pour les ions H^+ est expliquée par la présence de résidus hydrophobes (au lieu des résidus polaires permettant la coordination de Na^+) et possiblement aussi à cause d'interactions stériques dues à son large anneau-c de 15 sous-unités. Ainsi, la coordination d'ions H^+ dans l'anneau-c serait principalement limitée au groupement carboxyle conservé et la possible implication de groupements carbonyles dans une sous-unité c donnée et une voisine (ion H^+ stabilisé via le groupement carboxyle conservé sur la HTM2 et via des ponts hydrogènes via des résidus de la HTM1 et 2 d'une sous-unité c avec des résidus de la HTM2 de la sous-unité c voisine). Des études chez *B. pseudofirmus* OF4 (Laura Preiss et al. 2010; Laura Preiss et al. 2014) montrent un réseau de coordination encore plus hydrophobique, impliquant la coordination d'une molécule d'eau (rôle joué par P51), du groupement carboxyle et d'un résidu dans la HTM2 de la sous-unité c voisine (V21). Ce mode de coordination serait également présent chez *E. coli*. Chez *B. pseudofirmus*, étant alcalinophile donc dans un milieu pauvre en ions H^+ , une lysine est retrouvée invariablement dans la sous-unité a à la position 218 et aurait un rôle de capture de protons. La mutation de ce résidu en une glycine et une arginine fait perdre la capacité de la souche à produire de l'ATP à des pH supérieurs à 8.5. Ceci reflète une relation entre la structure/composition de l'ATP synthétase et le pH de l'environnement.

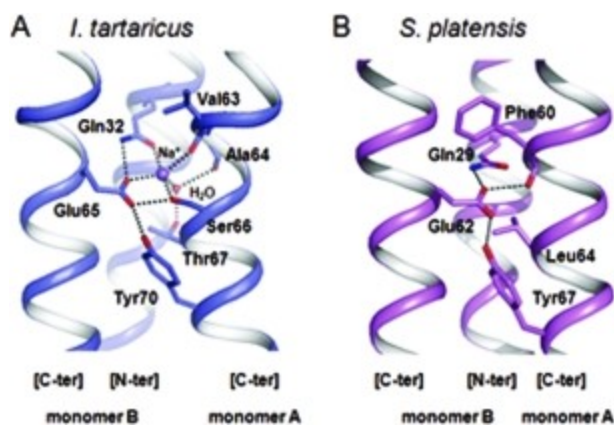


Figure 5. Structures cristallographiques présentant les sites de liaisons pour les protons H^+/Na^+ . Chez *I. tartaricus* (A) et chez *S. platensis* (B). Les résidus impliqués dans les liaisons sont représentés en « bâton » et les liens hydrogènes en pointillés, figure modifiée de Segala *et al.* (2012).

Suivant la protonation du groupement carboxyle conservé, il y a changement d'interaction entre le groupement carboxyle protoné et la charge du stator (Arg210) entraînant un mouvement relatif de la HTM4 et 5 de la sous-unité a et un mouvement de rotation de la sous-unité c (rendu neutralisé) au travers de la membrane lipidique jusqu'à la prochaine sous-unité et ainsi de suite. Il a été identifié qu'il y aurait d'autres possibles interactions entre a et c favorisant ce mouvement : ponts hydrogène entre cArg50 et aSer202/206 ainsi qu'entre cThr51 et aSer202/206. Certaines chaînes latérales volumineuses contenues dans les résidus Phe53, Met57 et Met65 de la sous-unité pourraient empiéter au niveau de la sous-unité a, ce qui causerait des interactions avec la sous-unité a pour favoriser également le mouvement rotatoire. Suivant une rotation de 360° , le groupement carboxyle protoné revient à l'interface a/c, interagissant de nouveau avec aArg210 favorisant le relâchement du proton via le mouvement de son HTM. De là les protons passent dans un second canal hydrophile vers le cytoplasme, assuré par diverses interactions complexes entre les HTM des sous-unités a et c (impliquant possiblement les résidus aSer206, aLys203, aSer199, Arg50 d'une sous-unité c ainsi que Thr51 et Gln52 de la sous-unité c suivante). Finalement la rotation de l'anneau-c va entraîner la rotation de γ , étant physiquement lié à la surface cytoplasmique de l'anneau-c, forçant la rotation de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$, menant ainsi à rotation des sites catalytiques pour la synthèse d'ATP (von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth

2009; von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; Martin et al. 2015; Fillingame and Steed 2014; Girvin and Rastogi 1999; Fillingame, Angevine, and Dmitriev 2003).

1.3.4 Vue d'ensemble du mode d'action de la Bédaquiline

La bédaquiline (R207910 ou TMC207) appartient à la classe récente d'antibiotiques diarylquinolines et possède une bonne activité contre les mycobactéries (Koul et al. 2007). Les études démontrent que ce composé est un excellent candidat pour le traitement de la tuberculose résistante aux antibiotiques (Andries et al. 2005). La bédaquiline agit sur l'ATP synthétase des mycobactéries et est efficace autant sur le phénotype actif des mycobactéries (réplication des cellules) que sur le phénotype de dormance des cellules (Koul et al. 2008). Ce composé agit sélectivement chez les mycobactéries (CMI₉₀ de 0,004 µg/ml pour *M. smegmatis* et de 0,06 µg/ml pour *M. tuberculosis*) (Koul et al. 2007), ayant très peu d'effet sur l'ATP synthétase humaine et des effets secondaires mineurs chez les patients (A. C. Haagsma et al. 2009). Chez *Mycobacterium*, il a été prouvé que l'ATP synthétase est essentielle, autant sur milieux avec des sources fermentables que non fermentables, pour les bactéries en réplication et également pour celles en dormance (Tran and Cook 2005; Koul et al. 2008). *M. tuberculosis* possède une FPM de -110 mV (avec contribution équivalente du $\Delta\psi$ et du ΔpH), alors que l'on retrouve typiquement -200 mV chez les bactéries. Cette faible FPM chez *M. tuberculosis* représenterait possiblement une adaptation à un environnement pauvre en nutriments et/ou pauvre en accepteurs d'électrons. Ainsi, il est supposé que l'anneau-c chez *M. tuberculosis* posséderait plus de 10 sous-unités, ce qui supporterait la synthèse d'ATP avec une faible FPM (Lu, Lill, and Bald 2014).

Plus précisément, les études indiquent que la bédaquiline cible la sous-unité c des mycobactéries (Koul et al. 2007). Entre autres, il a été montré que le composé se lie à la sous-unité c mycobactérienne purifiée (Koul et al. 2007). De plus, le séquençage de plusieurs isolats obtenus *in vitro* de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* résistants à la bédaquiline ont mené à l'identification de résidus localisés dans les environs du groupement carboxyle conservé (Andries et al. 2005; Koul et al. 2007) (Glu61 chez *M.*

tuberculosis). Des mutations dans des gènes non cibles, *pepQ* (Almeida et al. 2016) codant possiblement pour une aminopeptidase et *RV0678* (Andries et al. 2014) codant pour un régulateur négatif des pompes à efflux MmpS5-MmpL5, sont associés avec un faible niveau de résistance à la bédaquiline. Une première étude structurelle (« docking studies ») entre bédaquiline et la sous-unité c a d'abord proposé que la molécule s'y lie à l'interface a/c en prédisant que celle-ci imiterait le résidu basique important de la sous-unité a (Arg186) interagissant ainsi avec le groupement carboxyle conservé de la sous-unité c bloquant ainsi le mouvement rotatoire (de Jonge et al. 2007). Une étude a d'ailleurs montré que l'action de la bédaquiline n'est pas influencée par la FPM et qu'elle est active à pH acide et neutre (indiquant que sa forme protonée est active). Par contre, son activité diminue avec l'augmentation des forces ioniques (plus grande concentration ionique dans le milieu externe), indiquant que les interactions électrostatiques jouent un rôle significatif pour la liaison de l'antibiotique (Anna C. Haagsma et al. 2011). Une étude plus récente a mis en évidence un modèle prenant en compte les acides aminés suspectés d'être impliqués dans la liaison de la bédaquiline à la sous-unité c via la sélection de mutants supplémentaires *in vitro* de *M. tuberculosis* (et autres mycobactéries atypiques) résistants (Segala et al. 2012). Le tableau 1 (tiré de Segala *et al.* 2012) résume les différentes mutations obtenues (aux positions Leu59, Glu61, Ala63, Ile66 et Asp28), en lien avec les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et les fréquences de mutations. L'effet de ces mutations a été ensuite interprété par la construction d'un modèle de liaisons de la sous-unité c et de la bédaquiline, représenté à la figure 6 (Segala *et al.* 2012).

Tableau 1. Caractéristiques génotypiques et phénotypiques des mutants résistants à la bédaciline obtenus à partir de souches de référence (*M. tuberculosis* H37Rv et *M. smegmatis* mc2155) et de souches cliniques. Tableau tiré de Segala *et al.* (2012).

Strain	Mutation frequency	No. of <i>apvE</i> mutants/no. of colonies tested	Mutation found in subunit C (no. of mutants)	MIC (mg/liter)		Rate of MIC increase
				Mutant	Wild type	
<i>M. tuberculosis</i>				0.03		
H37Rv	10 ⁻⁸	4/25	A63P (4)	4		133
P	5 × 10 ⁻⁸	5/7	D28G (4)	0.5		16
			E61D (1)	ND ^a		
D	10 ⁻⁸	5/10	A63P (2)	4		133
			L59V (1)	0.25		8
			E61D (2)	0.5		16
LQ	10 ⁻⁸	5/6	D28G (1)	0.5		16
			E61D (2)	1		33
			A63P (1)	4		133
			I66M (1)	1		33
<i>M. fortuitum</i> B	1.5 × 10 ⁻⁸	9/9	D28A (9)	4	0.010	400
<i>M. abscessus</i> V	1.5 × 10 ⁻⁸	8/17	A63P (1)	16	0.25	64
			D28A (7)	8		32
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	ND	8/8	I66M (8)	16	0.12	133

^aND, not determinable.

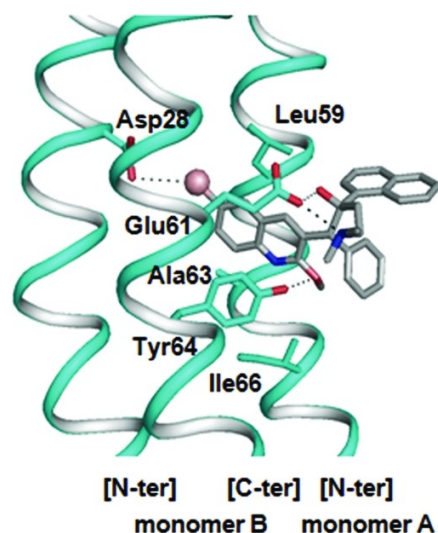


Figure 6. Modèle de liaisons optimales entre la bédaquiline et la sous-unité c de *M. tuberculosis*. Les résidus impliqués dans la région de liaisons sont représentés en « bâton » alors que les autres sont représentés en rubans. Les atomes d'oxygène et d'azote sont respectivement en rouge et en bleu. L'atome de brome de la bédaquiline est représenté par une sphère. Les liens hydrogène et halogène sont représentés par des lignes pointillées, figure tirée de Segala *et al.* (2012).

Ainsi, la bédaquiline serait liée à l'interface de deux sous-unités c par deux ponts-H avec la chaîne latérale de Glu61 et Tyr64, un pont salin avec le groupement carboxyle de Glu61 et une liaison halogène entre l'atome de brome (de la bédaquiline) et la chaîne latérale de Asp28. Le rôle de la mutation Ala63→proline est associé à une perturbation structurelle prévenant la liaison de la bédaquiline. Cet effet est supporté par le fait que *M. xenopi*, naturellement résistant à la bédaquiline, contient une méthionine à la position 63 au lieu d'une alanine (Petrella *et al.* 2006). La position Asp28 est le site avec diverses mutations obtenues (valine, alanine ou glycine). Le rôle de ces mutations est associé à la perte du groupement carboxyle contenu dans Asp28, permettant la liaison de la bédaquiline selon leur modèle. Des espèces non cibles ne possèdent pas de résidus équivalents tels que *E. coli* (Ile 28, CMI > 32 µg/ml) et *Corynebacterium jeikeium* (Val28, CMI = 4 µg/ml). La mutation Glu61→aspartate permet dans un premier temps de conserver le groupement carboxyle essentiel au transfert de protons et de conférer de la résistance à la bédaquiline par le fait que la chaîne latérale est plus courte dans l'aspartate que dans le glutamate (le

modèle suggère qu'il y a liaison entre la chaîne latérale de Glu61 et la bédaquiline, ainsi la chaîne plus courte retrouvée dans Asp61 affecterait la liaison de la molécule). Quant à la mutation Ile66→méthionine, le rôle est associé à l'introduction d'une chaîne latérale contenant un atome de soufre qui viendrait perturber les interactions en la sous-unité c et la bédaquiline. Le rôle de la mutation Leu59→valine, conférant de la résistance modérée, est associé avec des interactions stériques. Une étude plus récente propose un modèle similaire de liaison de la bédaquiline avec la sous-unité c chez *M. phlei* en mettant en évidence que la liaison de la bédaquiline entraîne un changement de conformation de Phe69, ceci entraînant un autre changement de conformation de la bédaquiline (L. Preiss et al. 2015). En résumé, la bédaquiline viendrait se lier à l'interface de deux sous-unités c via de nombreuses liaisons en imitant l'arginine conservé de la sous-unité a, ce qui résulte en un blocage du transfert des protons couplé à la synthèse d'ATP (de Jonge et al. 2007; Segala et al. 2012; L. Preiss et al. 2015).

Le mode d'action bactéricide de la bédaquiline a été démontré principalement chez *M. smegmatis* supportant la liaison à l'anneau-c, perturbant l'interface a/c et menant à un cycle de protons futile non couplé à la synthèse d'ATP (Hards et al. 2015). Tout comme les études *in vitro* chez *M. tuberculosis* montrant que la bédaquiline est bactéricide avec un délai dans le temps (Andries et al. 2005; Koul et al. 2014), celle-ci l'est également chez *M. smegmatis*. L'effet bactéricide est accéléré en milieu minimal, suggérant que des composantes en milieux riches permettent une survie partielle, effet également observé chez *M. tuberculosis* (Koul et al. 2014). Par contre, durant le challenge de traitement à la bédaquiline chez *M. smegmatis*, une baisse de l'expression des gènes de la glycolyse est observée et les challenges en présence de sources fermentables ou non fermentables donnent des résultats similaires. Ainsi, la production d'ATP via un métabolisme fermentaire n'est pas la cause de survie partielle. En contrepartie, l'expression de composantes de la chaîne respiratoire non translocatrice de protons (comme le cytochrome bd) est augmentée alors que les autres composantes sont généralement diminuées dans leur expression. Ceci suggère une réponse transcriptionnelle vers une baisse de la FPM générée. D'ailleurs, des mutants *cydAB* chez *M. tuberculosis* (Berney, Hartman, and Jacobs 2014) et *M. smegmatis* sont plus susceptibles à la bédaquiline comparativement à leur parent de

type sauvage. L'explication donnée par *Hards et al.* est que le flux de protons serait favorisé au travers des cytochromes bd à l'instar de composantes de la chaîne respiratoire qui translocalisent les protons, comme les *bc₁-aa₃*. Ultimement, les protons doivent être utilisés par l'ATP synthétase entre autres afin d'éviter une hyperpolarisation de la FPM, ce qui entraîne une hausse du $\Delta\psi$ et une production de ROS chez l'eucaryote (Formentini et al. 2012). Durant le challenge avec la bédaquiline chez *M. smegmatis*, une réponse transcriptionnelle en lien avec la production de ROS a été observée, par contre cela n'a pas été démontré biochimiquement et aucun changement du $\Delta\psi$ n'a été observé. À la place, une stimulation de l'utilisation de l'oxygène et un effondrement du ΔpH sont observés, menant ainsi à une dissipation de la FPM, étant létal pour les mycobactéries (Rao et al. 2008). Ainsi le mode d'action proposé pour la bédaquiline est un mécanisme de « découpleur » où elle doit se lier à l'anneau-c, perturbant l'interface a/c, menant à un cycle de protons futile non couplé à la synthèse d'ATP par F_1 . Le processus est électroneutre et pourrait être couplé à l'échange de K^+ par exemple, prenant en compte que l'ATP synthétase chez les eucaryotes peut agir en tant que pore non spécifique aux protons afin de maintenir le $\Delta\psi$ (Alavian et al. 2014). Il est possible que le changement de conformation causé par la liaison de la bédaquiline entraîne un phénomène similaire. Le processus ne pourrait être maintenu définitivement, donc en réponse à cette augmentation de flux de protons, il y aurait stimulation de l'utilisation de l'oxygène et rupture du ΔpH menant à la dissipation de la FPM, causant la mortalité chez *Mycobacterium* (Hards et al. 2015).

1.4 Tomatidine et dérivés

La tomatine est un métabolite important pour la défense antimicrobienne produite par plusieurs plantes de la famille des *Solanaceae*, comme la tomate (González-Lamothe et al. 2009). Certains champignons pathogènes de la tomate, comme *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, produisent des enzymes extracellulaires (tomatinases) capable de cliver la tomatine en sous-produits, dont l'alkaloïde stéroïdien tomatidine, possédant peu ou pas d'activité antifongique (Pérez-Espinosa, Roldán-Arjona, and Ruiz-Rubio 2001). Plusieurs études ont démontré une variété de propriétés pour la tomatidine : activités anti-cancer (Friedman et al. 2009; Choi et al. 2012), anti-inflammatoire (Chiu and Lin 2008), anti-

parasite (J M Medina et al. 2012; Jorge Mansur Medina et al. 2015) et anti-hyperlipidémique (Fujiwara et al. 2012). Par contre ces activités requièrent des concentrations dans l'ordre du micromolaire (μM) et la tomatine (versus la tomatidine) présente généralement une meilleure efficacité. Par exemple, dans le cas de l'inhibition de *Phytomonas serpens* (parasite de la tomate), la tomatine présente une IC_{50} de $9,9 \mu\text{M}$ et tue le parasite à une concentration $50 \mu\text{M}$. À cette concentration, la tomatidine inhibe seulement la croissance du parasite sans le tuer (Jorge Mansur Medina et al. 2015). Dans le laboratoire du Pr. François Malouin, il a été démontré que la tomatidine possède une activité prometteuse et sélective contre les SCV des *Bacillales* (incluant *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Listeria*), mais pas contre les souches prototypes (Guay et al., en soumission). Par contre, elle agit en synergie avec les aminoglycosides contre les souches prototypes et même pour des SARM et *S. aureus* résistant aux aminoglycosides (Mitchell et al. 2012; Mitchell, Gattuso, et al. 2011a; Boulanger et al. 2015). L'activité de la tomatidine est de l'ordre du nanomolaire avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de $0,06 \mu\text{g/ml}$ ou moins. Des tests d'invasion de culture cellulaire avec *S. aureus* SCV ont montré que la tomatidine est efficace pour tuer la forme persistance des SCV intracellulaire et que les concentrations utilisées sont non-cytotoxique (Mitchell, Gattuso, et al. 2011a). Afin de mieux comprendre les propriétés de la tomatidine et sa relation structure-activité (SAR), plusieurs dérivés de la tomatidine ont été produits dans le laboratoire du Pr. Éric Marsault (département de pharmacologie de l'Université de Sherbrooke) (Chagnon et al. 2014). De cette étude, un candidat prometteur a été identifié, FC04-100, présentant des propriétés similaires à la tomatidine en plus de posséder une activité bactéricide contre les souches prototypes (Guay et al, en soumission). La cible et le mode d'action de la tomatidine et de ses dérivés sont à confirmer. La figure 7 présente les structures de la tomatidine et du dérivé FC04-100.

Des pressions sélectives de la tomatidine sur une souche SCV de *S. aureus* va permettre d'obtenir des souches résistantes à l'antibiotique. Le séquençage génomique de ces isolats résistants va permettre l'identification de mutation dans un ou des gènes, cibles potentielles de la tomatidine. Afin d'obtenir une première confirmation de la cible de l'antibiotique, d'autres isolats résistants du SCV vont être obtenus par pression sélective de FC04-100,

dérivé avec une activité similaire à la tomatidine. Ces isolats résistants obtenus par la tomatidine ou par le dérivé devraient présenter un profil de résistance similaire et des mutations dans le ou les mêmes gènes, indiquant la cible potentielle. La sous-unité c de l'ATP synthétase a été identifiée comme étant la cible potentielle de la tomatidine. Des manipulations génétiques par surexpression ou remplacement allélique du gène de la sous-unité vont permettre de confirmer l'association du gène avec les résistances observées. Des tests biochimiques de l'activité de l'ATP synthétase en présence des composés devrait permettre d'observer une inhibition de son activité de synthèse d'ATP. Ainsi, il sera possible de confirmer la cible de la tomatidine et d'investiguer son mécanisme moléculaire.

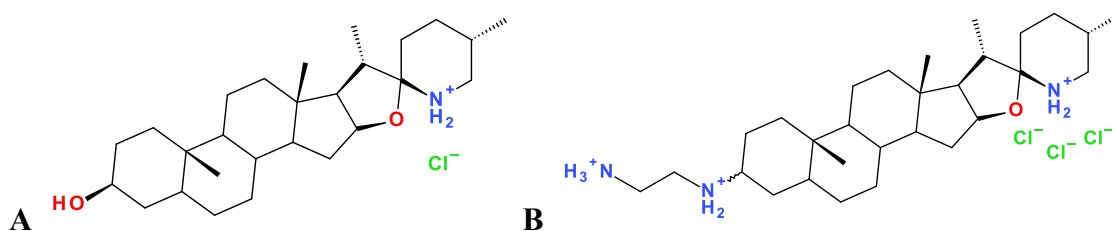


Figure 7. Structures de la tomatidine (A) et du dérivé FC04-100 (B). La ligne en vague indique une stéréochimie pour le composé (groupement vers l'avant ou vers l'arrière) menant aux composés FC-majeur et FC-mineur.

CHAPITRE 2 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

Titre: *Staphylococcus aureus* ATP synthase subunit C is the putative molecular target of Tomatidine.

Maxime Lamontagne Boulet¹, Isabelle Guay¹, Pierre-Étienne Jacques¹, Sébastien Rodrigue¹, Ryszard Brzezinski¹, Kamal Bouarab¹, Éric Marsault², and François Malouin¹

Ce présent travail indique pour la première fois la cible de la tomatidine, la sous-unité c de l'ATP synthétase, contre *S. aureus* SCV, souches associées à des infections chroniques et persistantes.

Contributions :

Maxime Lamontagne Boulet et Isabelle Guay : Ils ont effectué les manipulations biologiques menant à la sélection des souches résistantes, les tests de susceptibilité aux antibiotiques ainsi qu'une partie de l'analyse des mutations et séquences des gènes *ccpA* et *atpE*.

Pierre-Étienne Jacques : Il a effectué le traitement bioinformatique et l'analyse des résultats menant à l'identification des gènes d'intérêts.

Sébastien Rodrigue : Il a effectué les manipulations menant aux séquençages génomiques des isolats résistants à la tomatidine, le traitement bioinformatique des séquences et l'analyse de ces résultats.

Ryszard Brzezinski : Il a réalisé les modèles de la sous-unité C de l'ATP synthétase.

Kamal Bouarab : Initiateur du projet tomatidine, isolement initiale de la tomatidine.

Éric Marsault : Directeur du laboratoire ayant mené à la synthèse et séparation des deux stéréoisomères de FC04-100.

François Malouin : Directeur de recherche d'Isabelle Guay et Maxime Lamontagne Boulet.

¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1

²Département de Pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4

L'article est en préparation pour soumission dans le « Journal of antimicrobial chemotherapy ».

Titre: *Staphylococcus aureus* ATP synthase subunit C is the putative molecular target of Tomatidine.

Maxime Lamontagne Boulet¹, Isabelle Guay¹, Pierre-Étienne Jacques¹, Sébastien Rodrigue¹, Ryszard Brzezinski¹, Kamal Bouarab¹, Éric Marsault², and François Malouin^{1*}

¹Centre d'Étude et de Valorisation de la Diversité Microbienne (CEVDM), Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1

²Département de Pharmacologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4

Running Title: ATP synthase the target of Tomatidine.

* Corresponding author

ABSTRACT

Objectives: This study identified the putative molecular target of tomatidine (TO), a natural steroidal alkaloid from solanaceous plants, and of a diamine derivative replacing the 3 β -hydroxyl group of TO (FC04-100), both having potent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCVs). Notably, this work examined genomes of drug-resistant *S. aureus* strains to identify mutations in genes associated with resistance.

Methods: Drug-resistant *S. aureus* SCVs were raised by serial passage in presence of TO or FC04-100 or more specifically its major stereoisomer (FcM). Mutation frequencies for *S. aureus* SCVs vs. TO and its analog were also determined. Genomes were analyzed by Illumina sequencing to identify the putative molecular target and by Sanger sequencing in follow-up studies. Sequence alignments and structural models were performed to highlight the modified sequences and their consequences.

Results: *S. aureus* SCVs raised in presence of TO yielded highly resistant isolates after 30 passages (MIC >64 μ g/ml instead of 0.06 μ g/ml for the parental strain) that showed cross-resistance to FcM (MIC of 2 μ g/ml vs. 0.06 μ g/ml for the parental strain) as well as a resistance to the minor stereoisomer of FC04-100, Fcm, (8 μ g/ml instead of 1-2 μ g/ml). Genomic analysis revealed a single base substitution in the *ccpA* gene only for drug-resistant strains raised with TO and this mutation was associated with a lower level of resistance at 0.25-1 μ g/ml (passages 7, 11 and 20). On the other hand, a variety of single base substitutions in the *atpE* gene was associated to the highest level of resistance achieved for TO and FC04-100 (passage 30). Sequence alignments of the *atpE* gene revealed conserved motif sequences where mutations were located among species from the order of *Bacillales*. No FC04-100-resistant isolate could be raised from a non-SCV prototypical strain after serial passage on FcM (the MIC remained at 16 μ g/ml).

Conclusions: These results showed that *atpE* (coding for the ATP synthase subunit C) is the putative molecular target of TO and its analog FC04-100. Also, a low-level resistance

to TO involves the catabolite carbon protein A (encoded by *ccpA*). Conserved sequences in the *atpE* of *Bacillales* may explain the spectrum specificity of this class of compounds. The TO analog FC04-100, which also possesses noticeable activity against non-SCV *S. aureus* strains, appears to prevent resistance development in prototypic strains and limits the level of resistance that can be achieved in SCVs.

INTRODUCTION

Antibiotic resistance is now an overwhelming problem in human and veterinary medicine because of the absence of new therapeutic options to fight resistant pathogens (Talbot et al. 2006; Boucher et al. 2009). Most of the antibiotics developed in the last decade are still based on scaffolds discovered or designed 60 years ago (A. Coates et al. 2002; A. R. M. Coates, Halls, and Hu 2011). As an adaptive response, bacteria acquired efficient resistance mechanisms (Woodford and Ellington 2007; Ferri et al. 2015). Despite this, the development of antibiotics with new scaffolds reaching new validated molecular targets lacks in the pharmaceutical pipeline (A. R. M. Coates, Halls, and Hu 2011; A. Coates et al. 2002; Silver 2011). Among antibiotic-resistant pathogens, *Staphylococcus aureus* is often refractory to antibiotic treatment and cause both life-threatening and chronic diseases affecting several host species and body sites (Archer 1998; Casey, Lambert, and Elliott 2007; Goerke and Wolz 2004). Notably, the high prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) is an important problem worldwide and is often associated with recurrent and difficult-to-treat hospital- or community-acquired infections (Moreillon 2008; Dasenbrook et al. 2008). MRSA are also found in livestock and domestic pets, and transmissions from animals to humans have been reported (Leonard and Markey 2008; García-Álvarez et al. 2011). In addition, staphylococci infections are also associated with food poisoning (Tassew et al. 2010; Crago et al. 2012) as for several pathogens belonging to the order of *Bacillales*.

The *Bacillales* are Gram-positive bacteria with low G+C content divided into many genus (including *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Listeria*). Several species of *Bacillus* and *Listeria* can contaminate food and cause human diseases. For example, *Listeria monocytogenes* and

Bacillus cereus can cause gastro-intestinal infections as well as food poisoning (Vázquez-Boland et al. 2001; Bottone 2010). Though *L. monocytogenes* infections are relatively rare, they can lead to invasive listeriosis, cause severe symptoms and lead to death. Persistence of this pathogen in food is a major problem and is associated with transmission to humans (Ferreira et al. 2014). *Bacillus spp.* are well known for their ability to form endospores that can persist in environment (Checinska, Paszczynski, and Burbank 2015). Among pathogenic *Bacillus* species, *B. anthracis* can cause anthrax by contact with infected food producing animals as well as by direct contact with endospores when used as a biological weapon (Beierlein and Anderson 2011). However, *S. aureus* remains the most clinically relevant pathogen of this group. Among the mechanisms that allow *S. aureus* to cause persistent infection, is the ability of this pathogen to adopt a slow-growing phenotype. These *S. aureus* small-colony variants (SCVs) have been well-studied (Proctor et al. 2006) but little is known about SCVs from other *Bacillales*, although generation of SCVs from *L. monocytogenes* or *Bacillus spp.* is possible under a selective pressure with aminoglycoside antibiotics (Frenzel et al. 2015; Guay, n.d.; Curtis, Gram, and Knudsen 2016) similarly to that observed in *S. aureus* (Mitchell, Brouillette, et al. 2010).

S. aureus SCVs are associated with chronic and persistent infections as they are often recovered from lungs of patients with cystic fibrosis and also from osteomyelitis, septic arthritis, bovine mastitis and colonization of orthopedic devices (Atalla et al. 2008; Proctor et al. 2006b; Wolter et al. 2013; Kahl et al. 2003). SCVs have a dysfunctional respiratory chain, affecting its oxidative metabolism, causing a slow growth and changes in the expression of virulence factors (Proctor et al. 2006; Moisan et al. 2006). The reduced proton motive force (PMF) of SCVs causes a reduced susceptibility to aminoglycosides as this class of antibiotics needs an active PMF to cross the cell membrane barrier. The respiratory deficiency is often caused by mutation in genes involved in hemin or menadione biosynthesis which are important components in the respiratory chain (Proctor et al. 2006). Other conditions, which are less understood, are also reported to induce the SCV phenotype (Kahl 2014). SCVs have the ability to produce large quantities of biofilm (Mitchell, Séguin, et al. 2010; Mitchell, Brouillette, et al. 2010; R. Singh et al. 2009) and also persist within nonphagocytic host cells (Sendi and Proctor 2009; Mitchell, Gattuso, et al. 2011b;

Mitchell, Grondin, et al. 2011). Recently, it was shown that switching between the normal and SCV phenotypes is part of *S. aureus* pathogenesis, a phenomenon that may be involved in the establishment of chronic infections (Tuchscher et al. 2011).

Tomatidine (TO) is the aglycone version of the steroidal glycoalkaloid tomatine. Tomatine is produced by many *solanaceous* plants like the tomato to act as an important defense metabolite against fungi (González-Lamothe et al. 2009). Some studies have shown a variety of properties for TO like anticancer (Friedman et al. 2009; Choi et al. 2012), anti-inflammatory (Chiu and Lin 2008), anti-parasite (Medina et al. 2012; Medina et al. 2015) and anti-hyperlipidemic activities (Fujiwara et al. 2012). However, such activities require concentrations in micromolar range and tomatine generally exhibits a much better efficacy than TO for such properties. Also, TO has little or no cytotoxic effect on several types of cells in contrast to tomatine (Choi et al. 2012; Huang et al. 2015). On the other hand, our laboratory recently demonstrated the very potent and selective antibacterial activities of TO against SCVs of *Staphylococcus*, *Bacillus* and *Listeria* species, but not against strains of the normal phenotype of these species (Mitchell et al. 2012; Mitchell, Gattuso, et al. 2011b; Chagnon et al. 2014; Guay, n.d.). For such a biological activity, the potency of TO is in the nanomolar range with MICs of 0.06 µg/ml or lower against the SCVs of these bacteria. This selectivity allows no cytotoxicity to eukaryotic cell at TO concentrations showing intracellular killing of SCVs (Mitchell, Gattuso, et al. 2011b). More recently, we also investigated several structural analogs of TO in order to better understand its structure-activity relationship (Chagnon et al. 2014). From this study, we identified a promising TO derivative having a diamine replacing the 3β-hydroxyl group of TO (FC04-100, Figure 1). FC04-100 presents similar activities against SCVs but gained activity against prototypical strains (Chagnon et al. 2014) and importantly improved its bactericidal activity against *Listeria* SCVs (Guay, n.d.).

The precise mode of action of TO is still unknown although its activity is clearly associated with the respiratory chain. The aim of this study is to identify the molecular target of TO and its analog FC04-100. We studied drug-resistant *S. aureus* SCVs that were raised by a selective pressure to TO or its analog and used whole-genome sequencing to highlight the

molecular target associated with resistance. The subunit c of the bacterial ATP synthase appears as the ultimate molecular target of TO and FC04-100.

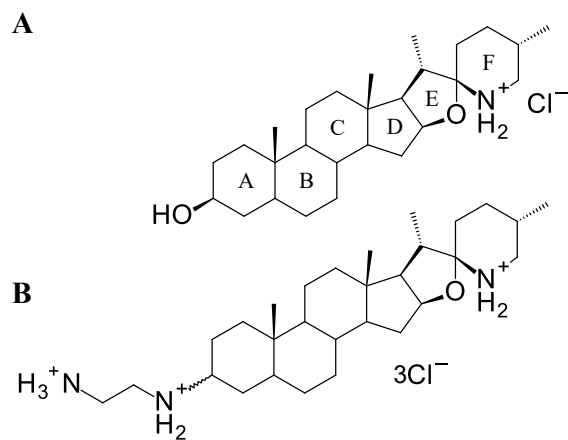


Figure 1. Structure of Tomatidine and FC04-100. Tomatidine (A) is a steroid alkaloid structurally characterized by 6 rings, 12 stereogenic centers, a 3 β -hydroxyl group and spiro-fused E, F rings in the form of an aminoketal. The tomatidine analog, FC04-100 (B) contains a diamine in position 3 of ring A.

METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *S. aureus* Newbould (ATCC 29740) and strain Newman were used as representatives of the normal phenotype. The strain *S. aureus* Newbould Δ *hemB* was used as the SCV counterpart. Newbould Δ *hemB* was generated from strain Newbould by disrupting the *hemB* gene with the *ermA* cassette by homologous recombination (Brouillette et al. 2004). Normal phenotype strains were grown in Mueller Hinton Broth cation adjusted (MHBCA; BD, Mississauga, ON, Canada). Except where otherwise stated, *S. aureus* Newbould Δ *hemB* and SCV mutants derivatives were grown in Brain Heart Infusion (BHI; BD, Mississauga, ON, Canada).

Chemical reagents and antibiotics. Tomatidine hydrochloride (TO) was from Molekula (Shaftesbury, Dorset, United Kingdom) or Onbio (Richmond Hill, ON, Canada) and gentamicin was from Sigma (Oakville, ON, Canada). TO and FC04-100 (mixed

stereoisomers at position 3, Figure 1) were solubilized at 2 g/L in DMSO. Gentamicin was solubilized at 10 g/L in water. Synthesis of FC04-100 was performed as previously described (Chagnon et al. 2014). The two diastereoisomers of FC04-100 (one major [FcM] and one minor [Fcm]) were separated by reverse-phase chromatography using a Waters preparative LC (Sample Manager 2767, Fraction collector), a binary gradient module 2545 with two 515 HPLC pumps and a system Fluidics Organizerescription SFO and a Photodiode Array Detector 2998 (column X Select CSH Prep C18 5 μ m OBD 19 x 250 mm² column, buffer A: 0.1% HCOOH in H₂O, buffer B: 0.1% HCOOH in ACN, flow 20 mL/min). Mass spectrometry spectra were recorded on a Waters SQ Detector 2 (electrospray) instrument (Mississauga, ON, Ontario Canada).

Antibiotic susceptibility testing. The minimal inhibitory concentrations (MICs) of drugs yielding no visible bacterial growth were determined by a broth microdilution technique by following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (Clsi 2013), except that the incubation period was extended to 48 h and the medium used was BHI for SCV strains.

Generation of TO-resistant mutants and FC04-100-resistant mutants. The generation of sequential TO-resistant mutants was induced by serial passage (30 passages of 48 h each) of *S. aureus* Newbould Δ *hemB* in a series of two-fold dilutions of TO in BHI in 96-well plates (range: 0.06 to 64 μ g/ml). At each passage, the MIC was determined and the well representing 0.5xMIC was diluted in fresh broth and used to inoculate ($\sim 10^5$ - 10^6 CFU/ml) a new series of TO dilutions for the next passage. At each passage, the 0.5xMIC well was also plated on BHI agar (BHIA) and the next day, three isolates were collected and frozen. Intermediate TO-resistant mutants were this way isolated from passages 7, 11 and 20. Following 30 passages, isolates from the highest TO concentration tested (64 μ g/ml) were purified on BHIA supplemented with 32 μ g/ml of TO.

The generation of sequential FC04-100-resistant mutants was similarly induced by serial passage (30 passages) of strain Newbould Δ *hemB*. Isolates showing a decreased

susceptibility were purified on BHIA supplemented with 4 µg/ml of FC04-100 (mixture of the stereoisomers).

The generation of non-SCV FC04-100-resistant mutants was also attempted by serial passage (30 passages) of the prototypic strain Newman on a series of two-fold dilutions of FC04-100 in BHI or MHBCA in 96-well plates (range: 0.25 to 128 µg/ml). In this case, the MIC of strain Newman remained at 16 µg/ml throughout the passages.

Spontaneous mutation frequency and mutant prevention concentration (MPC).

S. aureus Newbould Δ *hemB* from a 20-h agar plate was suspended in phosphate buffered saline 1x (PBS) to reach a 0.5 McFarland standard ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU/ml). Ten ml of this suspension were added to 90 ml of BHI and incubated for 24 h at 35°C and 250 rpm. One hundred µl of the culture were plated on each of a series of BHIA plates containing 2-fold increasing concentrations of TO (starting at 0.25 µg/ml) or 2-fold increasing concentrations of FcM (starting at 1 µg/ml). Controls with 2 and 8 µg/ml of rifampicin and with 3.2 % of DMSO (diluent for TO and FC-major) were also used. Tests were performed three independent times in triplicate. The mutation frequency was calculated by dividing the number of mutant colony growing after 72h at 35°C by the CFU of the plated inoculum. The MPC was defined as the lowest concentration where no mutant colony was observed three independent times and in each of the triplicate.

Whole-genome sequencing, assembly and annotation. Whole-genome shotgun libraries (3 isolates per passage of interest) were prepared and sequenced using the Illumina Technology. Briefly, genomic DNA was extracted using the Qiagen QIAamp DNA mini kit and fragmented to a size of ~200-400 bp by treatment with the dsDNA Shearase enzyme (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. Libraries were then prepared according to Rodrigue et al. 2010. Illumina sequencing was performed on a Illumina HiSeq 2000 Sequencing system at the Plateau de Biologie Moléculaire et génomique fonctionnelle of the Institut de Recherche Cliniques de Montréal. Samples were multiplexed in a single sequencing lane and approximately 1 to 2 million paired-end reads of 50 bp were obtained for each library. The resulting reads were de novo assembled using

the Roche gsAssembler version 2.6. Contigs sequences were aligned and annotated using the reference genome of *S. aureus* strain Newman with ABACAS (Assefa et al. 2009). and RATT (Otto et al. 2011). TO-resistant *S. aureus* Newbould Δ *hemB* sequences were compared against the parental SCV strain Newbould Δ *hemB* to identify SNPs.

PCR and Sanger sequencing. Mutations were confirmed by PCR amplification with specific primers to *S. aureus* targets genes. *atpE*-fwd (TTGATTCA CCAGCGCGTATTGTC) and *atpE*-rev (AGGTATCTGCTTCAATCAGCG) were used for *atpE* gene amplification. Two sets of primers were used for *ccpA* gene: *ccpA*deb-fwd (CAAGCTTTTCGCTAAATTTTCC), *ccpA*deb-rev (CGCCTTCTTTATAACTTTCA GC), *ccpA*fin-fwd (ATGGTATTATTTTCCTTGGTGGT) and *ccpA*fin-rev (GCG AGTTGGTACGAATCTAC). Sanger sequencing was performed using capillary electrophoresis (Plateforme de séquençage et de génotypage des génomes, centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire à Laval (CHUL), Québec, Canada).

RESULTS

Generation and selection of mutants.

In order to identify the molecular target of TO, we raised TO-resistant mutants in a *S. aureus* SCV strain (Newbould Δ *hemB*). These mutants were selected by serial passage in broth containing two-fold dilutions of TO and 3 isolated colonies were picked from passages of interest (*i.e.*, showing an increase of TO MIC). A low-level resistance for TO was observed at passage 7 (P7intR-1,-2,-3) and remained at passages 11 (P11intR-1,-2,-3) and 20 (P20intR-1,-2,-3) (the MIC increases from 0.06 to 0.25-1 μ g/ml) and a high-level of resistance was observed after 30 passages (SaR1-1,-2,-3) (MIC was >64 μ g/ml). These serial passages were performed two more times and the same stepwise increase in TO resistance was observed by reaching a high level of resistance at passage 30 (SaR3-1,-2,-3 ad SaR4-1,-2,-3), except that the low-level resistance appeared at passages 15 and 18. Serial passages were also performed another time starting with a low-level resistant clone isolated from the initial passage 7 (P7intR-1) and these steps also led to a high-level

resistance at passage 30 (SaR2,-1,-2,-3). In the latter case, only clones from passage 30 were isolated (high-level of resistance). See each mutant description and MICs for TO, FC04-100 stereoisomers and gentamicin in Table 1.

For all mutants with a high-level of resistance to TO and that were raised by a selective pressure from TO (SaR1, SaR2, SaR3, SaR4; Table 1), a cross-resistance was observed with both stereoisomers of the FC04-100 analogs (FcM and Fcm). The increase of resistance of the mutants for TO represented a >1024-fold increase (the MIC jumped from 0.06 µg/ml to >64 µg/ml), but only a 32 fold-increase in resistance for FcM (from 0.06 to 2 µg/ml) and a 4 to 8-fold-increase for Fcm (from 1-2 to 8 µg/ml) (Table 1). Interestingly, the drug-resistant mutants of the *S. aureus* SCV that were selected with FC04-100 (mutant SaR5 and SaR6, Table 2) showed the same susceptibility profile than *S. aureus* SCV selected with TO (SaR1, SaR2, SaR3, SaR4; Table 1), which, in addition to the cross-resistance, is another indication of a similar mode of action for both TO and the FC04-100 analog.

Since both FC04-100 stereoisomers (FcM and Fcm) possess some antibacterial activity against prototypic strains of *S. aureus* (see Table 1), we tried to raise mutants using a selective pressure by FC04-100. Using the same approach as above, we failed to obtain any FC04-100-resistant mutants from prototypical *S. aureus* after 40 passages.

Table 1. Susceptibility profile of resistant SCV strains selected after serial passages in presence of tomatidine.

Strains	MIC (µg/ml)			
	TO ¹	FcM ¹	Fcm ¹	GEN ¹
<i>S. aureus</i> Newbould	>64	2-4	8-16	0.25
<i>S. aureus</i> Newbould Δ <i>hemB</i>	0.06	0.06	1-2	8
P7intR-1,-2,-3 ²	0.25	ND	ND	8
P11intR-1,-2,-3 ²	0.25-0.5	ND	ND	8
P20intR-1,-2,-3 ²	0.25-1	ND	ND	8
SaR1-1,-2,-3 ³	>64	2	8	8
SaR2-1,-2,-3 ⁴	>64	2	8	8
SaR3-1,-2,-3 ³	>64	2	8	8
SaR4-1,-2,-3 ³	>64	2	8	8

¹TO, tomatidine; FcM, FC04-100 major stereoisomer; Fcm, FC04-100 minor stereoisomer; GEN, gentamicin; ND, not determined.

²Three clones from *S. aureus* Newbould Δ *hemB* after 7, 11 or 20 passage in presence of TO.

³Three clones from *S. aureus* Newbould Δ *hemB* after 30 passage in presence of TO.

⁴Three clones from a clone of *S. aureus* Newbould Δ *hemB* with low-level of resistance (P7intR-1) to TO after further passage in presence of TO to reach 30 passages.

Table 2. Susceptibility profile of resistant SCV strains selected after 30 serial passages in presence of FC04-100.

Strains	MIC (µg/ml)			
	TO ¹	FcM ¹	Fcm ¹	GEN ¹
<i>S. aureus</i> Newbould	>64	2-4	8-16	0.25
<i>S. aureus</i> Newbould Δ <i>hemB</i>	0.03-0.06	0.03	1-2	8
SaR5-1,-2,-3 ²	>64	2	8-16	8-16
SaR6-1,-2,-3 ²	>64	2	8	8

¹TO, tomatidine; FcM, FC04-100 major stereoisomer; Fcm, FC04-100 minor stereoisomer; GEN, gentamicin.

²Three clones from *S. aureus* Newbould Δ *hemB* after 30 passage in presence of FC04-100.

Spontaneous mutation frequency and MPC.

The mutation frequency measured for the *S. aureus* SCV strain Newbould $\Delta hemB$ on agar for the lowest concentration of TO tested (0.5 $\mu\text{g/ml}$, *i.e.*, the MIC of the low-level resistant mutants; Table 1) was $1.25\text{-}1.96 \times 10^{-8}$ and the frequency for FcM as selected on 1 $\mu\text{g/ml}$ (which is half the MIC of the resistant mutants; Table 2) was $7.14\text{-}11.8 \times 10^{-8}$. Mutation frequency for 1 to 8 $\mu\text{g/ml}$ of TO was $5.36\text{-}52.9 \times 10^{-9}$. At higher concentration of TO, 16 to 32 $\mu\text{g/ml}$, mutation frequency was ranging from $< 5.36 \times 10^{-9}$ to 23.2×10^{-9} and at 64 $\mu\text{g/ml}$ (MIC of the high-level resistant mutants is $> 64 \mu\text{g/ml}$; Table 1), no colony was visible. At the MIC of FcM for resistant mutant (2 $\mu\text{g/ml}$; Table 2), mutation frequency was $5.88\text{-}17.9 \times 10^{-9}$ and at higher concentration, 4-8 $\mu\text{g/ml}$, mutation frequency was ranging from $< 5.36 \times 10^{-9}$ to 12.5×10^{-9} , where no colony was visible at 8 $\mu\text{g/ml}$. The MPC was the concentration where no mutant colony was observed on both technical and biological triplicates. For TO and FcM, the MPC was 64 $\mu\text{g/ml}$ and 8 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Mutation frequency assays were also performed with 2 and 8 $\mu\text{g/ml}$ of rifampicin as a reference control and the resistance frequency was respectively $8.39\text{-}14.3 \times 10^{-8}$ and $4.82\text{-}10.4 \times 10^{-8}$ which is comparable to mutation frequencies found for the low-level resistance to TO and FcM.

Identification of mutations associated with resistance.

The *S. aureus* SCV strain was grown for 30 passages in presence of TO and 3 clones were isolated from passages of interest (showing an increase in the MIC compared the parental MIC). Genomic DNA was extracted from the parental strain and from selected clones. Whole-genome shotgun libraries were prepared and sequenced using the Illumina Technology. *S. aureus* Newbould $\Delta hemB$ TO-resistant mutants' sequences were compared against the parental SCV strain. Genomic analyses combined with MIC results lead to identify two mutations (Figure 2). A base substitution (G446T) was found in the low-level TO-resistant strains (represented by clones from passage 7, 11 and 20) in *ccpA* gene which encodes for the catabolite carbon protein A, a key metabolic regulator in low-GC Gram positive bacteria. This base substitution leads to an amino acid change (G149V). This

mutation was conserved in all high-level TO-resistant strains (SaR1, SaR2, SaR3, SaR4; Figure 3). The second mutation was found in high-level TO-resistant strains (clones from passage 30). It is a base substitution (G49T) in the *atpE* gene which encodes for the ATP synthase subunit C. Subunit C is forming the rotor which turns when a proton flux enters the ATP synthase in order to produce the energy necessary to synthesize ATP. This mutation also leads to an amino acid change (A17S) (Figure 4). Mutations in *ccpA* and *atpE* have been confirmed by PCR amplification and Sanger sequencing for the three clones with a high-level of resistance to TO (SaR1-1, -2, -3).

Following these results, other passages in presence of TO were performed with *S. aureus* Newbould Δ *hemB* and with a low-level TO-resistant strain (a clone from passage 17) as previously described. PCR amplification and Sanger sequencing were performed on 3 clones of passage 30 (high-level of TO resistance) for *ccpA* and *atpE* gene. The same base substitution in the *ccpA* gene was found in all high-level TO-resistant strains selected in the presence of TO (Figure 3), which confirmed the association of these gene in TO resistance. For the *atpE* gene, a new base substitution was found in high-level TO-resistant strains (C77T) which leads to an amino acid change (S26L) (Figure 4). These genes were also analyzed for drug-resistant strains selected with analog FC04-100. No mutation was found in *ccpA* gene (Figure 3), maybe consistent with the fact that only one level of resistance was found for the analog. For the *atpE* gene, two additional base substitutions were found (G52T and T139C). These two mutations also lead to an amino acid change (respectively G18C and F47L) (Figure 4).

Figure 2. Nucleic acid sequence alignments of the *ccpA* and *atpE* genes of *S. aureus* SCV resistant mutants selected under a TO selective pressure at passages 7, 11, 20 and 30 in comparison with the parental SCV strain Newbould Δ *hemB*. Single point mutation found in the TO-resistant strains are boxed.

	ccpA	ATP synthase subunit C
Parental <i>S. aureus</i> Newbould Δ <i>hemB</i> MIC = 0.06 μ g/ml	...440-AAATGCTAAGG-452...	...43-TAGGAGCAGGT-55...
Passage #7-11-20P7intR, P11intR, P20intR MIC = 0.25-1 μ g/ml	...440-AAATGTTAAGG-452...	...43-TAGGAGCAGGT-55...
Passage #30 SaR1-1,-2,-3 MIC = >64 μ g/ml	...440-AAATGTTAAGG-452...	...43-TAGGATCAGGT-55...

Figure 3. Amino acid sequence alignments of the catabolite control protein A (CcpA) for *S. aureus* SCV resistant mutants selected after 30 passages with tomatidine or FC04-100 compared to the parental SCV Newbould Δ *hemB*. Mutation position is indicated by the absence of a star. The different amino acids are in bold.

Newbould Δ <i>hemB</i>	121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNGKDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR1-1,-2,-3 (+TO)	121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR2-1,-2,-3 (+TO)	121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR3-1,-2,-3 (+TO)	121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR4-1,-2,-3 (+TO)	121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNV KDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR5-1,-2,-3 (+Fc)	121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNGKDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180
SaR6-1,-2,-3 (+Fc)	121---IFLGGTITEEMKELINQSSVPVVVSGTNGKDAHIA SVNIDFTEAAKEITGELIEKGAKSF--- 180

Figure 4. Amino acid sequence alignments of the ATP synthase subunit C for *S. aureus* SCV resistant mutants selected after 30 passages with tomatidine or FC04-100 compared to the parental SCV Newbould Δ *hemB*. Mutation position is indicated by the absence of a star. The different amino acids are in bold.

Newbould Δ <i>HemB</i>	MNLIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARQQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR1-1,-2,-3 (+TO)	MNLIAAAIAIGLSALG S GIGNGLIVSRTVEGVARQPEARQQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR2-1,-2,-3 (+TO)	MNLIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIV L R TVEGVARQPEARQQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR3-1,-2,-3 (+TO)	MNLIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIV L R TVEGVARQPEARQQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR4-1,-2,-3 (+TO)	MNLIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIV L R TVEGVARQPEARQQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR5-1,-2,-3 (+Fc)	MNLIAAAIAIGLSALG C IGNGLIVSRTVEGVARQPEARQQLMGIMFIGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70
SaR6-1,-2,-3 (+Fc)	MNLIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSRTVEGVARQPEARQQLMGIM L IGVGLVEALPIIGVVIAFMTFAG 70

The *atpE* gene is conserved among *Bacillales*

TO and its analog had an activity spectrum that appears to be specific to the order *Bacillales* (Guay et al, 2016), which include pathogens like *S. aureus*, *B. cereus* and *L. monocytogenes*. We thus compared the ATP synthase subunit C (AtpE) amino acid sequences among *Bacillales* and non-targeted species (Figure 5).

Also, using Blastp, and a comparison to *S. aureus* NCTC 8325, we found that sequences are highly similar with 100% identity for most of the *Staphylococcus* sp. (Newbould, USA 300 FPR3757, *S. pasteurii* and *S. warneri*), 96% for *S. saprophyticus*, 94% for the two others coagulase-negative staphylococci (*S. haemolyticus* and *S. lugdunensis*), 83% for pathogenic bacilli (*B. anthracis* and *B. cereus*) and the lowest identity was found at 75 to 79% for *B. subtilis*, *B. coagulans* and *Listeria* sp. (*L. monocytogenes* and *L. ivanovii*). The exception was *B. pseudofirmus*, which shared only 52% identity. Also, amino acids sequence of the subunit C for *S. aureus* NCTC 8325 has been compared with over 1000 strains of *S. aureus* (using Blastp) and were all 100% identical as for strains of *S. epidermidis* ATP synthase subunit C amino acid sequence. Interestingly, residues that have been found to be mutated in high-level of resistance to TO and its analog are conserved in all *Bacillales*, except S26 in *B. coagulans*. There are also sequences that are conserved around those residues and which are not conserved in non-target species as shown in Figure 5A. The conserved consensus sequence for *Bacillales* (*B. pseudofirmus* not included) is L--AAAIA-GL-ALGAGIGNGLIV--T-EG-ARQPE----L---MF-G--LVEALPII-VVIAF.

Blasting that consensus sequence finds all *Bacillales*. This consensus sequence where mutations associated with high-level resistance to TO and its analog are found could explain the specificity of the antibacterial activity of these drugs for *Bacillales* and may point out to the interaction site(s) between these drugs and subunit C.

In contrast, non-target species presented low identity for the AtpE sequence in comparison to that of *S. aureus* NCTC 8325. The highest similarity was found with *M. tuberculosis* having only 55% identity and the lowest was with *S. pneumonia* (31%). They were no significant identity match with the human sequence. Conserved consensus sequences that

have been found in *Bacillales* are absent in the non-target species which again could explain the absence of activity of TO against these species. Bedaquiline, now approved for *Mycobacterium tuberculosis* treatment (Cohen 2013), is an ATP synthase subunit C inhibitor specific to *Mycobacterium* (Andries et al. 2005). Also shown in Figure 5B for comparison, are mutation sites (not all presented here) that have been found in *Mycobacterium* strains and which provide resistance to bedaquiline (Segala et al. 2012).

Figure 5. Amino acid sequence alignments of the ATP synthase subunit C for selected species. **(A)** The alignments for several species of *Bacillales* present a consensus sequence which is highlighted in green. Residues that are identical to those of *S. aureus* are highlighted in yellow. Residues that have been found to be mutated in TO/FC04-100 resistant strains are in red and bold characters in *S. aureus* NCTC 8325 sequence. **(B)** Alignments for some species of *Bacillales* and bacterial species that are not targeted by TO and its analog. *Bacillales* present a consensus sequence which is highlighted in green. The changes in amino acids found in drug-resistant *S. aureus* (SaR1 to SaR6) are indicated below the alignments. The essential ion-binding glutamate (aspartate in *E. coli*) is indicated by an arrow. The changes in amino acids reported for the bedaquiline-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* or *M. smegmatis* (MyR denotes a mixture of these two species) are also indicated below the alignments.

A.

<i>S. aureus</i> NCTC 8325	MNL--IAAAIAIGLSALG AG IGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMGIM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT FAG 70
<i>S. aureus</i> Newbould	MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMGIM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT FAG 70
<i>S. aureus</i> USA300_FPR3757	MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMGIM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT FAG 70
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMGIM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT FAG 70
<i>S. pasteurii</i> SP1	MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMGIM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT FAG 70
<i>S. warneri</i> SG1	MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMGIM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT FAG 70
<i>S. saprophyticus</i> 15305	MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMGIM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT SL-- 68
<i>S. haemolyticus</i> JCSC1435	MGL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMS IM FI GI GLVEALPIIGVVIA MT LFQ 70
<i>S. lugdunensis</i> N920143	MGL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMS IM FI GI GLVEALPIIGVVIA MT LF 70
<i>B. anthracis</i> Ames	MSLGVIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPE EL KGA QT IM FI GV AL VEALPIIGVVIA MT VMNK 72
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	MSLGVIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPE EL KGA QT IM FI GV AL VEALPIIGVVIA MT VMNK 72
<i>B. subtilis</i> 6051-HGW	MNL--IAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEAGKE RT LM FI GV AL VEALPIIGVVIA MT LAFFG 70
<i>L. monocytogenes</i> HCC23	MSLGVIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEAR SM QT IM FI GV AL VEALPIIGVVIA MT VMNLNK 72
<i>L. ivanovii</i> PAM 55	MSLGVIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEAR SM QT IM FI GV AL VEALPIIGVVIA MT VMNLNK 72
<i>B. coagulans</i> 36D1	MSLGVIAAAIAIGLSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEAR GL QT IM FI GV AL VEALPIIGVVIA MT IALGR 72
Consensus sequence	L AAAIA GL ALGAGIGNGLIV T EG ARQPE L MF G LVEALPII VVIAF

B.

<i>S. aureus</i>	-----MNL-----IAAAIAIG 11
<i>L. monocytogenes</i>	-----MSL-----VIAAAIAVG 13
<i>B. subtilis</i>	-----MNL-----IAAAIAIG 11
<i>B. cereus</i>	-----MSL-----VIAAAIAIG 13
<i>B. anthracis</i>	-----MSL-----VIAAAIAIG 13
<i>S. pneumoniae</i>	-----MNL-----TFLGLC 9
<i>E. coli</i>	-----MENLNMDLLY-----MAAAVMMG 18
<i>M. smegmatis</i>	-----MDLDPNAIITAGALIGGGLIMG 22
<i>M. tuberculosis</i>	-----MDP--TIAAGALIGGGLIMA 20
<i>Homo sapiens</i>	MQTAGALFISPALIRCCTRGLIRPVASFLNSPVNSSKQPSYSNFPQLQVARREFQTSVVSRRIDITAAKFIFAG 73

<i>S. aureus</i>	---LSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEARGQLMGIM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT FAG---- 70
<i>L. monocytogenes</i>	---LGALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEAR SM QT IM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT VMNLNK---- 72
<i>B. subtilis</i>	---LGALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPEAGKE RT LM FI GVGLVEALPIIGVVIA MT LAFFG---- 70
<i>B. cereus</i>	---LSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPE EL KGA QT IM FI GV AL VEALPIIGVVIA MT VMNK---- 72
<i>B. anthracis</i>	---LSALGAGIGNGLIVSR TE EGVARQPE EL KGA QT IM FI GV AL VEALPIIGVVIA MT VMNK---- 72
<i>S. pneumoniae</i>	---IACMGVSVGEGLLMNGLFKSVARQPDMLSEFRSLMFLGVAFIEGTFVTLVFSFIK---- 66
<i>E. coli</i>	---LAAIGAAIGIGILGGKFLGAARQPDLIPLLR TQ FFIVMGLVDAIPMIAVGLGLYVMFAVA---- 79
<i>M. smegmatis</i>	---GGAIGAGIGDGIAGNALISGIARQPEAQGR LF TPFFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFPATPGLO 86
<i>M. tuberculosis</i>	---GGAIGAGIGDGVAGNALISGVARQPEAQGR LF TPFFITVGLVEAAYFINLAFMALFVFPATPVK-- 81
<i>Homo sapiens</i>	AATVGVAGSGAGIGTVFGSLIIGYARNPSLKQQLFSYAILGFALSEAMGLFCLMVAFILFAM---- 136

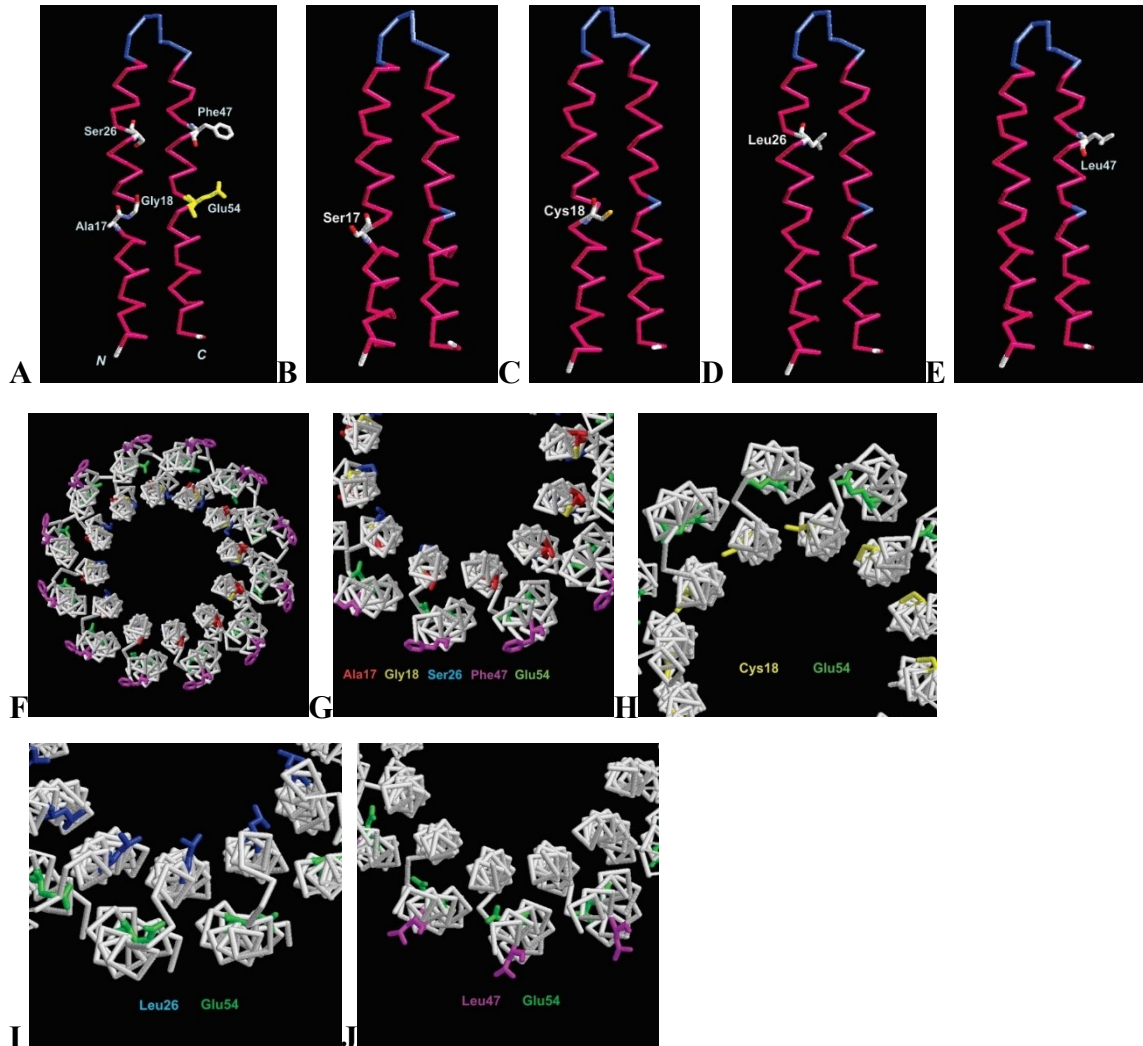
↓

MyR	V	D	P	M
MyR	P			
SaR1	S			
SaR2-R3-R4		L		
SaR5	C			
SaR6			L	

ATP synthase subunit C model

The impact of these mutations was investigated by building a model structure of the monomeric subunit C of *S. aureus* Newbould Δ *hemB* ATP synthase and of the dodecameric version using SWISS-MODEL (Guex and Peitsch 1997) built on homology with PDB 3ZO6 and PDB 1WU0. Figure 6A shows the positions of the four residues that have been identified in all TO/FC04-100-resistant SCV strains (Ala17, Gly18, Ser26 and Phe47). Each of these residues are putative binding/interaction site for TO and/or its analog and are near of the essential ion-binding site residue Glu54, suggesting that the binding of the compounds could interfere with the function of residue Glu54. Figures 6B to 6E show each mutated residue, which are all individually associated with high-level resistance. It can be hypothesized that each mutated residue affects TO/FC04-100 binding or interaction with the ATP synthase subunit C or allows proton transfer even if TO/FC04-100 is bound. Figure 6F and 6G present dodecameric assembly of subunit C of non-resistant strain and figure 6H to 6J present respectively mutated residues Cys18, Leu26 and Leu47 in the dodecameric assembly. Residues Leu26, in comparison to Ser26, clearly appears exposed at the surface of the subunit C in the internal portion of the assembly and Leu47, in comparison to Phe47, appears exposed in the external portion. The most interesting observation is Cys18, located between the subunits, which is also exposed out and thus may affect assembly integrity.

Figure 6. The ATP synthase subunit C models and multimeric models (build on homology with PDB 3ZO6 and PDB 1WU0 using 3D-Jigsaw server). **A.** Position of residues (in white) implicated in resistance in the wild-type sequence, essential residue Glu54 is in yellow. **B.** Position of the mutation Ser17. **C.** Position of the mutation Cys18. **D.** Position of the mutation Leu26. **E.** Position of the mutation Leu47. **F.** Overview of the multimeric assembly of subunit C. **G.** Position of residues (Ala17, orange; Gly18, yellow; Ser26, blue; Phe47, purple) implicated in resistance in wild-type multimeric assembly, essential residue Glu54 is in green. **H.** Position of the mutation Cys18 in the multimeric assembly. **I.** Position of the mutation Leu26 in the multimeric assembly. **J.** Position of the mutation Leu47 in the multimeric assembly.



DISCUSSION

In this study, we raised drug-resistant mutants from a *S. aureus* SCV strain by serial passage in presence of TO or its analog (FC04-100) in order to highlight the molecular target of these antibiotics. Results pinpoint the mutations to the ATP synthase subunit C gene (Figure 4). Each of these mutations resulted in the same resistance profile, whether strains were selected with TO or FC04-100 (Tables 1 and 2). However, the level of resistance reached was higher for TO (a >1024-fold increase in TO MIC) than that observed with the analog (a 4- to 32-fold increase in FC04-100 MIC) indicating a more potent antibacterial activity for the analog. Also, no drug-resistant mutants were obtained after a *S. aureus* prototype strain was exposed to the analog FC04-100 supporting that this compound may interact perhaps differently with the ATP synthase target, for example using multiple interaction sites. Another possibility would be that the increased potency of FC04-100 better prevents the stepwise acquisition of resistance seen with TO, for which a *ccpA* mutation seemed to be a prerequisite for a subsequent mutation in *atpE* and high-level resistance (Figure 2). Noteworthy, the major and minor stereoisomers of FC04-100 could not be clearly defined but FcM was more potent. This was consistent to what we previously saw with the 3 β - and 3 α -hydroxyl stereoisomers of TO among which the 3 β form was much more potent (Chagnon et al, 2013). Mutation frequencies were similar for TO and FcM, but the MPC was much lower for FcM (64 μ g/ml for TO and 8 μ g/ml for FcM).

The ATP synthase is a ubiquitous enzyme that utilizes the energy stored in the transmembrane electrochemical gradient in order to synthesize ATP (Capaldi and Aggeler 2002). However, its essentiality differs across species (von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth 2009). Little is known about *S. aureus*, however, some studies showed that the ATP synthase is important for its growth and survival (Balemans et al. 2012; Ko et al. 2006). This reinforces the hypothesis that any mutation in *atpE* needs to allow some level of functionality. For other *Bacillales* like in *L. monocytogenes*, it was reported that the ATP synthase also plays a role in pH homeostasis (Cotter, Gahan, and Hill 2000). The deletion of the ATP synthase in *B. subtilis* greatly

affects growth (Santana et al. 1994). Our previous work showed that TO and its analog FC04-100 have a narrow but specific spectrum of activity against *Bacillales* SCVs (Guay et al, 2016). We show here that specificity could be explained by the presence of conserved amino acid sequences in the ATP synthase subunit C across species of the *Bacillales* order, and which are not present in others bacterial species. This also indicates that the cellular function(s) of the ATP synthase is of primary importance for survival in the *Bacillales*, at least in the SCV background in which the respiratory chain is already altered. Previous studies revealed that extensive metabolic remodeling occur in persistent bacteria, such as SCVs (Proctor et al. 2006; Kriegeskorte et al. 2011; Seggewiss et al. 2006), sporulation in *Bacillus spp* (Hoch 1993), and slow-growing bacteria and biofilm-associated bacteria (Lewis 2007; Høiby et al. 2010; Mitchell, Brouillette, et al. 2010). It has been generally hypothesized that targeting energy metabolism is an interesting target (Hurdle et al. 2011). Also, Balemans *et al.* (2012) showed that targeting the Gram-positive ATP synthase is a possible approach towards discovery of new antibacterial agents.

The bacterial ATP synthase subunit C is a validated antimicrobial target since the novel antibiotic bedaquiline, targeting the mycobacterial ATP synthase subunit C, was recently approved for treatment of tuberculosis (Andries et al. 2005; Cohen 2013). Hards *et al.* (2015) proposed that bedaquiline binds to subunit C and perturbs the subunits A and C interface which leads to a futile proton cycle that stops the ATP synthase operations. In order to allow the translocation of the protons, subunits A and C must move relative to each other. The proton transfer chain, elucidated in *E. coli* (Girvin and Rastogi 1999) and in *M. tuberculosis* (de Jonge et al. 2007), presents two conserved residues of interest: Glu61 of subunit C in *M. tuberculosis* (Asp61 in *E. coli* and Glu54 in *S. aureus*) that transfer the proton it receives to R186 of subunit A (R210 in *E. coli* and presumably R174 in *S. aureus*). Further functional assays and structural models showed that bedaquiline interacts with the ATP synthase subunit C by several means and covers the c-rotor ion-binding site thus preventing the proton cycle and ATP synthase activity (Preiss et al. 2015). The ATP synthase subunit C model presented in Figure 6 indicates the position of mutated residues that give resistance to TO and its analog, and thus representing putative binding sites, which suggest that such compounds could affect the nearby essential glutamate. TO could

also interact with the essential glutamate similarly to that described for bedaquiline. In that case and such as that found for bedaquiline, any of the mutated residues found in TO-resistant strains could modify the structure of ATP synthase subunit C in a manner that prevents TO binding or allows proton transfer even in presence of bound TO. Models of the ATP synthase subunit C (Figure 6) also showed that 3 of the 4 identified mutations leading to high-level resistance (Gly18Cys, Ser26Leu and Phe47Leu) could affect the integrity of this protein, particularly Gly18Cys that may affect the dodecameric assembly. However, further structural studies need to be performed to better understand the mechanism for resistance.

Besides, the potency of TO towards SCVs is also intriguing. The ATP synthase activity is directly linked to the weakness of SCVs: the proton-motive force (Proctor et al. 2006). The proton-motive force normally generated by a strong electron transport chain is used by the bacterial ATP synthase to generate ATP (Hong and Pedersen 2008). Interestingly, all TO low-level resistant SCVs showed a mutation in the *ccpA* gene (which encodes for the catabolite control protein A) and this mutation is conserved in sequential clones showing high-level resistance to TO further having a mutation in *atpE*. CcpA is a highly conserved regulator carbon catabolite repressor in low-GC Gram-positive bacteria and has been intensively studied in *B. subtilis* (Henkin 1996; Tobisch et al. 1999; H.-J. Kim, Roux, and Sonenshein 2002), *S. xylosum* (Jankovic, Egeter, and Brückner 2001) and *S. aureus* (Seidl et al. 2006; Seidl et al. 2009). It functions as a catabolite activator or repressor allowing the bacteria to use preferential carbon sources over secondary carbon sources. For example, in presence of glucose, it enhances the glycolysis and inhibits the TCA cycle. As such, a mutation in *ccpA* may certainly affect substrates formation for the respiratory chain and thus the proton gradient and could perhaps moderately compensate for the consequences of the ATP synthase inhibition by TO.

Overall, this study allowed to identify ATP synthase subunit C as the putative cellular target for TO and its analog FC04-100. The specificity of the antibacterial activity for *Bacillales* appears to be explained by the presence of conserved motif sequences in their ATP synthase subunit C. FC04-100 is a promising candidate for the development of this

class of antibiotics as resistance development appears more difficult and its potency is much increased against prototypic *Bacillales* strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to *Calcul Québec* and the *Centre de Calcul Scientifique of the Université de Sherbrooke* for access and technical support while using the *Mammouth-mp2* supercomputer.

FUNDING

This study was supported by an operation grant from Cystic Fibrosis Canada to FM and EM and by a team grant from the *Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies* (FQRNT) to FM, KB and EM. MLB received studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and from FQRNT during this study.

TRANSPARENCY DECLARATIONS

None to declare.

REFERENCES

Abrahams, Jan Pieter, Andrew G. W. Leslie, René Lutter, and John E. Walker. 1994.

“Structure at 2.8 Å Resolution of F1-ATPase from Bovine Heart Mitochondria.”

Nature 370 (6491): 621–28. doi:10.1038/370621a0.

Abranches, Jacqueline, Marcelle M Nascimento, Lin Zeng, Christopher M Browngardt,

Ze Zhang T Wen, Mercedes F Rivera, and Robert A Burne. 2008. “CcpA Regulates

Central Metabolism and Virulence Gene Expression in *Streptococcus Mutans*.”

Journal of Bacteriology 190 (7). American Society for Microbiology: 2340–49.

doi:10.1128/JB.01237-07.

Ahn, S.-J., K. C. Rice, J. Oleas, K. W. Bayles, and R. A. Burne. 2010. “The *Streptococcus Mutans* Cid and Lrg Systems Modulate Virulence Traits in Response to Multiple Environmental Signals.” *Microbiology* 156 (10): 3136–47.

doi:10.1099/mic.0.039586-0.

Alavian, Kambiz N, Gisela Beutner, Emma Lazrove, Silvio Sacchetti, Han-A Park, Pawel Licznarski, Hongmei Li, et al. 2014. “An Uncoupling Channel within the c-Subunit Ring of the F1FO ATP Synthase Is the Mitochondrial Permeability Transition Pore.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (29). National Academy of Sciences: 10580–85. doi:10.1073/pnas.1401591111.

Almeida, Deepak, Thomas Ioerger, Sandeep Tyagi, Si-Yang Li, Khisimuza Mdluli, Koen Andries, Jacques Grosset, Jim Sacchettini, and Eric Nuermberger. 2016. “Mutations in *pepQ* Confer Low-Level Resistance to Bedaquiline and Clofazimine in *Mycobacterium Tuberculosis*.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (8): 4590–99. doi:10.1128/AAC.00753-16.

Andries, Koen, Peter Verhasselt, Jerome Guillemont, Hinrich W H Göhlmann, Jean-Marc Neefs, Hans Winkler, Jef Van Gestel, et al. 2005. “A Diarylquinoline Drug Active

on the ATP Synthase of Mycobacterium Tuberculosis.” *Science (New York, N.Y.)* 307 (5707): 223–27. doi:10.1126/science.1106753.

Andries, Koen, Cristina Villellas, Nele Coeck, Kim Thys, Tom Gevers, Luc Vranckx, Nacer Lounis, Bouke C de Jong, and Anil Koul. 2014. “Acquired Resistance of Mycobacterium Tuberculosis to Bedaquiline.” *PloS One* 9 (7): e102135. doi:10.1371/journal.pone.0102135.

Archer, G L. 1998. “Staphylococcus Aureus: A Well-Armed Pathogen.” *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 26 (5): 1179–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597249>.

Arnaud, Maryvonne, Arnaud Chastanet, and Michel Débarbouillé. 2004. “New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria.” *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11). American Society for Microbiology (ASM): 6887–91. doi:10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004.

Assefa, S., T. M. Keane, T. D. Otto, C. Newbold, and M. Berriman. 2009. “ABACAS: Algorithm-Based Automatic Contiguation of Assembled Sequences.” *Bioinformatics* 25 (15): 1968–69. doi:10.1093/bioinformatics/btp347.

Atalla, Heba, Carlton Gyles, Christian L Jacob, Helene Moisan, François Malouin, and

- Bonnie Mallard. 2008. "Characterization of a Staphylococcus Aureus Small Colony Variant (SCV) Associated with Persistent Bovine Mastitis." *Foodborne Pathogens and Disease* 5 (6): 785–99. doi:10.1089/fpd.2008.0110.
- Balemans, Wendy, Luc Vranckx, Nacer Lounis, Ovidiu Pop, Jérôme Guillemont, Karen Vergauwen, Selenia Mol, et al. 2012. "Novel Antibiotics Targeting Respiratory ATP Synthesis in Gram-Positive Pathogenic Bacteria." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (8): 4131–39. doi:10.1128/AAC.00273-12.
- Behari, J, and P Youngman. 1998. "A Homolog of CcpA Mediates Catabolite Control in *Listeria Monocytogenes* but Not Carbon Source Regulation of Virulence Genes." *Journal of Bacteriology* 180 (23): 6316–24.
- Beierlein, J M, and A C Anderson. 2011. "New Developments in Vaccines, Inhibitors of Anthrax Toxins, and Antibiotic Therapeutics for *Bacillus Anthracis*." *Current Medicinal Chemistry* 18 (33): 5083–94.
- Berney, Michael, Travis E Hartman, and William R Jacobs. 2014. "A *Mycobacterium Tuberculosis* Cytochrome *Bd* Oxidase Mutant Is Hypersensitive to Bedaquiline." *mBio* 5 (4): e01275-14. doi:10.1128/mBio.01275-14.
- Bottone, Edward J. 2010. "Bacillus Cereus, a Volatile Human Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews* 23 (2): 382–98. doi:10.1128/CMR.00073-09.

Boucher, Helen W, George H Talbot, John S Bradley, John E Edwards, David Gilbert, Louis B Rice, Michael Scheld, Brad Spellberg, and John Bartlett. 2009. “Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America.” *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 48 (1): 1–12. doi:10.1086/595011.

Boulanger, Simon, Gabriel Mitchell, Kamal Bouarab, Ûric Marsault, André Cantin, Eric H Frost, Eric Déziel, and François Malouin. 2015. “Bactericidal Effect of Tomatidine-Tobramycin Combination against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus and Pseudomonas Aeruginosa Is Enhanced by Interspecific Small-Molecule Interactions.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (12): 7458–64. doi:10.1128/AAC.01711-15.

Boyer, Paul D. 1997. “THE ATP SYNTHASE—A SPLENDID MOLECULAR MACHINE.” *Annual Review of Biochemistry* 66 (1). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA : 717–49. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717.

Brouillette, Eric, Alejandro Martinez, Bobbi J Boyll, Norris E Allen, and François Malouin. 2004. “Persistence of a Staphylococcus Aureus Small-Colony Variant under Antibiotic Pressure in Vivo.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 41 (1): 35–41. doi:10.1016/j.femsim.2003.12.007.

- Cabezón, E, M J Runswick, A G Leslie, J E Walker, JP. Abrahams, AGW. Leslie, AT. Brunger, et al. 2001. “The Structure of Bovine IF(1), the Regulatory Subunit of Mitochondrial F-ATPase.” *The EMBO Journal* 20 (24). EMBO Press: 6990–96. doi:10.1093/emboj/20.24.6990.
- Capaldi, Roderick A, and Robert Aggeler. 2002. “Mechanism of the F(1)F(0)-Type ATP Synthase, a Biological Rotary Motor.” *Trends in Biochemical Sciences* 27 (3): 154–60.
- Casey, A L, P A Lambert, and T S J Elliott. 2007. “Staphylococci.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 29 Suppl 3 (May): S23-32. doi:10.1016/S0924-8579(07)72175-1.
- Chagnon, Félix, Isabelle Guay, Marc-André Bonin, Gabriel Mitchell, Kamal Bouarab, François Malouin, and Éric Marsault. 2014. “Unraveling the Structure-Activity Relationship of Tomatidine, a Steroid Alkaloid with Unique Antibiotic Properties against Persistent Forms of Staphylococcus Aureus.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 80 (June): 605–20. doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.019.
- Chai, Yunrong, Frances Chu, Roberto Kolter, and Richard Losick. 2007. “Bistability and Biofilm Formation in *Bacillus Subtilis*.” *Molecular Microbiology* 67 (2): 254–63. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06040.x.

- Charpentier, Emmanuelle, Ana I Anton, Peter Barry, Berenice Alfonso, Yuan Fang, and Richard P Novick. 2004. "Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10): 6076–85. doi:10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004.
- Checinska, Aleksandra, Andrzej Paszczynski, and Malcolm Burbank. 2015. "Bacillus and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival." *Annual Review of Food Science and Technology* 6 (January). Annual Reviews: 351–69. doi:10.1146/annurev-food-030713-092332.
- Chiang, C., C. Bongiorno, and M. Perego. 2011. "Glucose-Dependent Activation of Bacillus Anthracis Toxin Gene Expression and Virulence Requires the Carbon Catabolite Protein CcpA." *Journal of Bacteriology* 193 (1): 52–62. doi:10.1128/JB.01656-09.
- Chiu, Feng-Lan, and Jen-Kun Lin. 2008. "Tomatidine Inhibits iNOS and COX-2 through Suppression of NF-kappaB and JNK Pathways in LPS-Stimulated Mouse Macrophages." *FEBS Letters* 582 (16): 2407–12. doi:10.1016/j.febslet.2008.05.049.
- Choi, Suk Hyun, Jun-Bae Ahn, Nobuyuki Kozukue, Hyun-Jeong Kim, Yosuke Nishitani, Ling Zhang, Masashi Mizuno, Carol E Levin, and Mendel Friedman. 2012. "Structure-Activity Relationships of α -, β (1)-, γ -, and δ -Tomatine and Tomatidine against Human Breast (MDA-MB-231), Gastric (KATO-III), and Prostate (PC3)

Cancer Cells.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (15). American Chemical Society: 3891–99. doi:10.1021/jf3003027.

Clsi. 2013. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Vol. 32.

Coates, Anthony, Yanmin Hu, Richard Bax, and Clive Page. 2002. “The Future Challenges Facing the Development of New Antimicrobial Drugs.” *Nature Reviews. Drug Discovery* 1 (11): 895–910. doi:10.1038/nrd940.

Coates, Anthony R M, Gerry Halls, and Yanmin Hu. 2011. “Novel Classes of Antibiotics or More of the Same?” *British Journal of Pharmacology* 163 (1): 184–94. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x.

Cohen, Jon. 2013. “Infectious Disease. Approval of Novel TB Drug Celebrated--with Restraint.” *Science (New York, N.Y.)* 339 (6116): 130. doi:10.1126/science.339.6116.130.

Cotter, Paul D., Cormac G.M. Gahan, and Colin Hill. 2000. “Analysis of the Role of the *Listeria Monocytogenes* F0F1-ATPase Operon in the Acid Tolerance Response.” *International Journal of Food Microbiology* 60 (2–3): 137–46. doi:10.1016/S0168-1605(00)00305-6.

- Crago, B, C Ferrato, S J Drews, L W Svenson, G Tyrrell, and M Louie. 2012. "Prevalence of Staphylococcus Aureus and Methicillin-Resistant S. Aureus (MRSA) in Food Samples Associated with Foodborne Illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010." *Food Microbiology* 32 (1): 202–5. doi:10.1016/j.fm.2012.04.012.
- Crooke, Adrienne K, James R Fuller, Markus W Obrist, Sarah E Tomkovich, Nicholas P Vitko, and Anthony R Richardson. 2013. "CcpA-Independent Glucose Regulation of Lactate Dehydrogenase 1 in Staphylococcus Aureus." *PloS One* 8 (1): e54293. doi:10.1371/journal.pone.0054293.
- Cui, Longzhu, Hui-min Neoh, Akira Iwamoto, and Keiichi Hiramatsu. 2012. "Coordinated Phenotype Switching with Large-Scale Chromosome Flip-Flop Inversion Observed in Bacteria." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (25): E1647-56. doi:10.1073/pnas.1204307109.
- Curtis, Thomas D, Lone Gram, and Gitte M Knudsen. 2016. "The Small Colony Variant of *Listeria Monocytogenes* Is More Tolerant to Antibiotics and Has Altered Survival in RAW 264.7 Murine Macrophages." *Frontiers in Microbiology* 7. Frontiers Media SA: 1056. doi:10.3389/fmicb.2016.01056.
- Dasenbrook, Elliott C, Christian A Merlo, Marie Diener-West, Noah Lechtzin, and Michael P Boyle. 2008. "Persistent Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus

and Rate of FEV1 Decline in Cystic Fibrosis.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (8): 814–21. doi:10.1164/rccm.200802-327OC.

de Jonge, Marc R, Luc H M Koymans, Jérôme E G Guillemont, Anil Koul, and Koen Andries. 2007. “A Computational Model of the Inhibition of Mycobacterium Tuberculosis ATPase by a New Drug Candidate R207910.” *Proteins* 67 (4): 971–80. doi:10.1002/prot.21376.

Deutscher, J, M H Saier, and Jr. 1983. “ATP-Dependent Protein Kinase-Catalyzed Phosphorylation of a Seryl Residue in HPr, a Phosphate Carrier Protein of the Phosphotransferase System in Streptococcus Pyogenes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (22). National Academy of Sciences: 6790–94.

Deutscher, Josef. 2008. “The Mechanisms of Carbon Catabolite Repression in Bacteria.” *Current Opinion in Microbiology* 11 (2): 87–93. doi:10.1016/j.mib.2008.02.007.

Deutscher, Josef, Christof Francke, and Pieter W Postma. 2006. “How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 70 (4). American Society for Microbiology (ASM): 939–1031. doi:10.1128/MMBR.00024-06.

Diez, Manuel, Boris Zimmermann, Michael Börsch, Marcelle König, Enno

Schweinberger, Stefan Steigmiller, Rolf Reuter, et al. 2004. "Proton-Powered Subunit Rotation in Single Membrane-Bound F₀F₁-ATP Synthase." *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (2). Nature Publishing Group: 135–41. doi:10.1038/nsmb718.

Dimroth, Peter. 1997. "Primary Sodium Ion Translocating Enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1318 (1): 11–51. doi:10.1016/S0005-2728(96)00127-2.

Donlan, Rodney M, and J William Costerton. 2002. "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 167–93.

Drobinskaya, I.Ye., I.A. Kozlov, M.B. Murataliev, and E.N. Vulfson. 1985. "Tightly Bound Adenosine Diphosphate, Which Inhibits the Activity of Mitochondrial F₁ - ATPase, Is Located at the Catalytic Site of the Enzyme." *FEBS Letters* 182 (2): 419–24. doi:10.1016/0014-5793(85)80346-X.

Dupuy, B, and A L Sonenshein. 1998. "Regulated Transcription of *Clostridium Difficile* Toxin Genes." *Molecular Microbiology* 27 (1): 107–20.

Feniouk, Boris A, Yasuyuki Kato-Yamada, Masasuke Yoshida, Toshiharu Suzuki, C. von

- Ballmoos, G.M. Cook, P. Dimroth, et al. 2010. “Conformational Transitions of Subunit Epsilon in ATP Synthase from Thermophilic Bacillus PS3.” *Biophysical Journal* 98 (3). Elsevier: 434–42. doi:10.1016/j.bpj.2009.10.023.
- Ferreira, V, M Wiedmann, P Teixeira, and M J Stasiewicz. 2014. “Listeria Monocytogenes Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health.” *Journal of Food Protection* 77 (1): 150–70. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-150.
- Ferri, Maurizio, Elena Ranucci, Paola Romagnoli, and Valerio Giaccone. 2015. “Antimicrobial Resistance: A Global Emerging Threat to Public Health Systems.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, October. doi:10.1080/10408398.2015.1077192.
- Fillingame, Robert H., and P. Ryan Steed. 2014. “Half Channels Mediating H⁺ Transport and the Mechanism of Gating in the Fo Sector of Escherichia Coli F1Fo ATP Synthase.” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. doi:10.1016/j.bbabi.2014.03.005.
- Fillingame, Robert H, Christine M Angevine, and Oleg Y Dmitriev. 2003. “Mechanics of Coupling Proton Movements to c -Ring Rotation in ATP Synthase.” *FEBS Letters* 555 (1): 29–34. doi:10.1016/S0014-5793(03)01101-3.

- Formentini, Laura, María Sánchez-Aragó, Laura Sánchez-Cenizo, and José M. Cuezva. 2012. “The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response.” *Molecular Cell* 45 (6): 731–42. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.008.
- Frenzel, Elrike, Markus Kranzler, Timo D Stark, Thomas Hofmann, and Monika Ehling-Schulz. 2015. “The Endospore-Forming Pathogen *Bacillus Cereus* Exploits a Small Colony Variant-Based Diversification Strategy in Response to Aminoglycoside Exposure.” *mBio* 6 (6). doi:10.1128/mBio.01172-15.
- Friedman, Mendel, Carol E Levin, Seung-Un Lee, Hyun-Jeong Kim, In-Seon Lee, Jae-Oke Byun, and Nobuyuki Kozukue. 2009. “Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach Cancer Cells.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (13). American Chemical Society: 5727–33. doi:10.1021/jf900364j.
- Fujita, Yasutaro. 2009. “Carbon Catabolite Control of the Metabolic Network in *Bacillus Subtilis*.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73 (2): 245–59. doi:10.1271/bbb.80479.
- Fujiwara, Yukio, Naoko Kiyota, Keiichiro Tsurushima, Makiko Yoshitomi, Hasita Horlad, Tsuyoshi Ikeda, Toshihiro Nohara, Motohiro Takeya, and Ryoji Nagai. 2012. “Tomatidine, a Tomato Sapogenol, Ameliorates Hyperlipidemia and

Atherosclerosis in apoE-Deficient Mice by Inhibiting Acyl-CoA:cholesterol Acyl-Transferase (ACAT).” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (10): 2472–79. doi:10.1021/jf204197r.

García-Álvarez, Laura, Matthew T G Holden, Heather Lindsay, Cerian R Webb, Derek F J Brown, Martin D Curran, Enid Walpole, et al. 2011. “Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* with a Novel *mecA* Homologue in Human and Bovine Populations in the UK and Denmark: A Descriptive Study.” *The Lancet. Infectious Diseases* 11 (8): 595–603. doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8.

Garzoni, Christian, and William L Kelley. 2009. “*Staphylococcus Aureus*: New Evidence for Intracellular Persistence.” *Trends in Microbiology* 17 (2): 59–65. doi:10.1016/j.tim.2008.11.005.

Giammarinaro, Philippe, and James C Paton. 2002. “Role of RegM, a Homologue of the Catabolite Repressor Protein CcpA, in the Virulence of *Streptococcus Pneumoniae*.” *Infection and Immunity* 70 (10): 5454–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228270>.

Girvin, Mark E., and Vinit K. Rastogi. 1999. “Structural Changes Linked to Proton Translocation by Subunit c of the ATP Synthase.” *Nature* 402 (6759). Nature Publishing Group: 263–68. doi:10.1038/46224.

- Goerke, Christiane, and Christiane Wolz. 2004. "Regulatory and Genomic Plasticity of *Staphylococcus Aureus* during Persistent Colonization and Infection." *International Journal of Medical Microbiology : IJMM* 294 (2–3): 195–202.
doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.013.
- Gómez-González, Carmen, Joshi Acosta, Jennifer Villa, Laura Barrado, Francisca Sanz, M Angeles Orellana, Joaquín R Otero, and Fernando Chaves. 2010. "Clinical and Molecular Characteristics of Infections with CO₂-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus Aureus*." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (8): 2878–84.
doi:10.1128/JCM.00520-10.
- González-Lamothe, Rocío, Gabriel Mitchell, Mariza Gattuso, Moussa S Diarra, François Malouin, and Kamal Bouarab. 2009. "Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens." *International Journal of Molecular Sciences* 10 (8): 3400–3419. doi:10.3390/ijms10083400.
- Gordon, Rachel J., and Franklin D. Lowy. 2008. "Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infection." *Clinical Infectious Diseases* 46 (S5): S350–59.
doi:10.1086/533591.
- Guay, Isabelle. n.d. "Tomatidine and Analog FC04-100 Possess Bactericidal Activities against the Small Colony Variants of Some Firmicutes Including Those of *Listeria Monocytogenes* and Are Bactericidal in Combination with Aminoglycosides against

Their Normal Phenotype.” *BMC Complementary and Alternative Medicine*.

Guex, N, and M C Peitsch. 1997. “SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling.” *Electrophoresis* 18 (15): 2714–23. doi:10.1002/elps.1150181505.

Haagsma, A. C., R. Abdillahi-Ibrahim, M. J. Wagner, K. Krab, K. Vergauwen, J. Guillemont, K. Andries, H. Lill, A. Koul, and D. Bald. 2009. “Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP Synthase Compared with That towards the Eukaryotic Homologue.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (3): 1290–92. doi:10.1128/AAC.01393-08.

Haagsma, Anna C., Ioana Podasca, Anil Koul, Koen Andries, Jerome Guillemont, Holger Lill, and Dirk Bald. 2011. “Probing the Interaction of the Diarylquinoline TMC207 with Its Target Mycobacterial ATP Synthase.” *PLoS ONE* 6 (8): 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0023575.

Hards, K., J. R. Robson, M. Berney, L. Shaw, D. Bald, A. Koul, K. Andries, and G. M. Cook. 2015. “Bactericidal Mode of Action of Bedaquiline.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, March. doi:10.1093/jac/dkv054.

Henkin, Tina M. 1996. “The Role of the CcpA Transcriptional Regulator in Carbon Metabolism in *Bacillus Subtilis*.” *FEMS Microbiology Letters* 135 (1). The Oxford

University Press: 9–15. doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb07959.x.

Hirono-Hara, Y, H Noji, M Nishiura, E Muneyuki, K Y Hara, R Yasuda, K Kinoshita, and M Yoshida. 2001. “Pause and Rotation of F(1)-ATPase during Catalysis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24). National Academy of Sciences: 13649–54. doi:10.1073/pnas.241365698.

Hoch, J A. 1993. “Regulation of the Phosphorelay and the Initiation of Sporulation in *Bacillus Subtilis*.” *Annual Review of Microbiology* 47 (January): 441–65. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.002301.

Høiby, Niels, Thomas Bjarnsholt, Michael Givskov, Søren Molin, and Oana Ciofu. 2010. “Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (4): 322–32. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.

Hong, Sangjin, and Peter L Pedersen. 2008. “ATP Synthase and the Actions of Inhibitors Utilized to Study Its Roles in Human Health, Disease, and Other Scientific Areas.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 72 (4). American Society for Microbiology (ASM): 590–641, Table of Contents. doi:10.1128/MMBR.00016-08.

Huang, Huarong, Shaohua Chen, Jeremiah Van Doren, Dongli Li, Chelsea Farichon, Yan He, Qiuyan Zhang, et al. 2015. “ α -Tomatine Inhibits Growth and Induces Apoptosis in HL-60 Human Myeloid Leukemia Cells.” *Molecular Medicine Reports* 11 (6):

4573–78. doi:10.3892/mmr.2015.3238.

Hurdle, Julian G., Alex J. O'Neill, Ian Chopra, and Richard E. Lee. 2011. "Targeting Bacterial Membrane Function: An Underexploited Mechanism for Treating Persistent Infections." *Nature Reviews Microbiology* 9 (1): 62–75. doi:10.1038/nrmicro2474.

Hyndman, D J, Y M Milgrom, E A Bramhall, and R L Cross. 1994. "Nucleotide-Binding Sites on Escherichia Coli F1-ATPase. Specificity of Noncatalytic Sites and Inhibition at Catalytic Sites by MgADP." *The Journal of Biological Chemistry* 269 (46): 28871–77.

Iyer, R., N. S. Baliga, and A. Camilli. 2005. "Catabolite Control Protein A (CcpA) Contributes to Virulence and Regulation of Sugar Metabolism in Streptococcus Pneumoniae." *Journal of Bacteriology* 187 (24): 8340–49. doi:10.1128/JB.187.24.8340-8349.2005.

Jankovic, I, O Egeter, and R Brückner. 2001. "Analysis of Catabolite Control Protein A-Dependent Repression in Staphylococcus Xylosus by a Genomic Reporter Gene System." *Journal of Bacteriology* 183 (2): 580–86. doi:10.1128/JB.183.2.580-586.2001.

Jiang, W., J. Hermolin, and R. H. Fillingame. 2001. "The Preferred Stoichiometry of c

Subunits in the Rotary Motor Sector of Escherichia Coli ATP Synthase Is 10.”

Proceedings of the National Academy of Sciences 98 (9): 4966–71.

doi:10.1073/pnas.081424898.

Kahl, Barbara C. 2014. “Small Colony Variants (SCVs) of Staphylococcus Aureus--a

Bacterial Survival Strategy.” *Infection, Genetics and Evolution : Journal of*

Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases 21

(January): 515–22. doi:10.1016/j.meegid.2013.05.016.

Kahl, Barbara C, Angelika Duebbers, Gabriele Lubritz, Johannes Haeberle, Hans G

Koch, Barbara Ritzerfeld, Marion Reilly, et al. 2003. “Population Dynamics of

Persistent Staphylococcus Aureus Isolated from the Airways of Cystic Fibrosis

Patients during a 6-Year Prospective Study.” *Journal of Clinical Microbiology* 41

(9): 4424–27.

Kato-Yamada, Yasuyuki. 2005. “Isolated ϵ Subunit of *Bacillus Subtilis* F₁-ATPase

Binds ATP.” *FEBS Letters* 579 (30): 6875–78. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.036.

Kim, Hyun-Jin, Agnes Roux, and Abraham L. Sonenshein. 2002. “Direct and Indirect

Roles of CcpA in Regulation of Bacillus Subtilis Krebs Cycle Genes.” *Molecular*

Microbiology 45 (1): 179–90. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03003.x.

Kim, Jeong-Ho, Young-Ki Yang, and Glenn H Chambliss. 2005. “Evidence That Bacillus

Catabolite Control Protein CcpA Interacts with RNA Polymerase to Inhibit Transcription.” *Molecular Microbiology* 56 (1): 155–62. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04496.x.

Ko, K.S., J.Y. Lee, J.H. Song, J.Y. Baek, W.S. Oh, J.S. Chun, and H.S. Yoon. 2006. “Screening of Essential Genes in Staphylococcus Aureus N315 Using Comparative Genomics and Allelic Replacement Mutagenesis.” *Journal of Microbiology and Biotechnology*.

Konkol, M. A., K. M. Blair, and D. B. Kearns. 2013. “Plasmid-Encoded ComI Inhibits Competence in the Ancestral 3610 Strain of Bacillus Subtilis.” *Journal of Bacteriology* 195 (18): 4085–93. doi:10.1128/JB.00696-13.

Koul, Anil, Najoua Dendouga, Karen Vergauwen, Brenda Molenberghs, Luc Vranckx, Rudy Willebrords, Zorica Ristic, et al. 2007. “Diarylquinolines Target Subunit c of Mycobacterial ATP Synthase.” *Nature Chemical Biology* 3 (6). Nature Publishing Group: 323–24. doi:10.1038/nchembio884.

Koul, Anil, Luc Vranckx, Najoua Dendouga, Wendy Balemans, Ilse Van den Wyngaert, Karen Vergauwen, Hinrich W H Göhlmann, et al. 2008. “Diarylquinolines Are Bactericidal for Dormant Mycobacteria as a Result of Disturbed ATP Homeostasis.” *The Journal of Biological Chemistry* 283 (37): 25273–80. doi:10.1074/jbc.M803899200.

- Koul, Anil, Luc Vranckx, Neeraj Dhar, Hinrich W.H. Göhlmann, Emre Özdemir, Jean-Marc Neefs, Melanie Schulz, et al. 2014. “Delayed Bactericidal Response of Mycobacterium Tuberculosis to Bedaquiline Involves Remodelling of Bacterial Metabolism.” *Nature Communications* 5 (February). Nature Publishing Group: 14–16. doi:10.1038/ncomms4369.
- Krah, Alexander. 2015. “Linking Structural Features from Mitochondrial and Bacterial F-Type ATP Synthases to Their Distinct Mechanisms of ATPase Inhibition.” *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 119 (1): 94–102. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.06.005.
- Krah, Alexander, Denys Pogoryelov, Julian D Langer, Peter J Bond, Thomas Meier, and José D Faraldo-Gómez. 2010. “Structural and Energetic Basis for H⁺ versus Na⁺ Binding Selectivity in ATP Synthase Fo Rotors.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 (6–7): 763–72. doi:10.1016/j.bbabbio.2010.04.014.
- Kriegeskorte, André, Stephanie Grubmüller, Claudia Huber, Barbara C Kahl, Christof von Eiff, Richard A Proctor, Georg Peters, Wolfgang Eisenreich, and Karsten Becker. 2014. “Staphylococcus Aureus Small Colony Variants Show Common Metabolic Features in Central Metabolism Irrespective of the Underlying Auxotrophism.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (January): 141. doi:10.3389/fcimb.2014.00141.

- Kriegeskorte, André, Simone König, Gunnar Sander, Alexander Pirkel, Esther Mahabir, Richard A Proctor, Christof von Eiff, Georg Peters, and Karsten Becker. 2011. "Small Colony Variants of Staphylococcus Aureus Reveal Distinct Protein Profiles." *Proteomics* 11 (12): 2476–90. doi:10.1002/pmic.201000796.
- Lamichhane-Khadka, R, J T Riordan, A Delgado, A Muthaiyan, T D Reynolds, B J Wilkinson, and J E Gustafson. 2008. "Genetic Changes That Correlate with the Pine-Oil Disinfectant-Reduced Susceptibility Mechanism of Staphylococcus Aureus." *Journal of Applied Microbiology* 105 (6): 1973–81. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03956.x.
- Leiba, Jade, Torsten Hartmann, Marie-Eve Cluzel, Martin Cohen-Gonsaud, Frédéric Delolme, Markus Bischoff, and Virginie Molle. 2012. "A Novel Mode of Regulation of the Staphylococcus Aureus Catabolite Control Protein A (CcpA) Mediated by Stk1 Protein Phosphorylation." *The Journal of Biological Chemistry* 287 (52): 43607–19. doi:10.1074/jbc.M112.418913.
- Leonard, F C, and B K Markey. 2008. "Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Animals: A Review." *Veterinary Journal (London, England : 1997)* 175 (1): 27–36. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.008.
- Lewis, Kim. 2007. "Persister Cells, Dormancy and Infectious Disease." *Nature Reviews*.

Microbiology 5 (1): 48–56. doi:10.1038/nrmicro1557.

Li, Chunling, Fei Sun, Hoonsik Cho, Vamshi Yelavarthi, Changmo Sohn, Chuan He, Olaf Schneewind, and Taeok Bae. 2010. “CcpA Mediates Proline Auxotrophy and Is Required for *Staphylococcus Aureus* Pathogenesis.” *Journal of Bacteriology* 192 (15): 3883–92. doi:10.1128/JB.00237-10.

Löfblom, J., N. Kronqvist, M. Uhlén, S. Ståhl, and H. Wernérus. 2007. “Optimization of Electroporation-Mediated Transformation: *Staphylococcus Carnosus* as Model Organism.” *Journal of Applied Microbiology* 102 (3). Blackwell Publishing Ltd: 736–47. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03127.x.

Lopez, J M, and B Thoms. 1977. “Role of Sugar Uptake and Metabolic Intermediates on Catabolite Repression in *Bacillus Subtilis*.” *Journal of Bacteriology* 129 (1): 217–24.

Lu, Ping, Holger Lill, and Dirk Bald. 2014. “ATP Synthase in Mycobacteria: Special Features and Implications for a Function as Drug Target.” *Biochimica et Biophysica Acta*, March. doi:10.1016/j.bbabbio.2014.01.022.

Martin, James, Jennifer Hudson, Tassilo Hornung, and Wayne D Frasch. 2015. “Fo-Driven Rotation in the ATP Synthase Direction against the Force of F1 ATPase in the FoF1 ATP Synthase.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (17): 10717–28.

doi:10.1074/jbc.M115.646430.

Medina, J M, J C F Rodrigues, W De Souza, G C Atella, and H Barrabin. 2012.

“Tomatidine Promotes the Inhibition of 24-Alkylated Sterol Biosynthesis and Mitochondrial Dysfunction in *Leishmania Amazonensis* Promastigotes.”

Parasitology 139 (10): 1253–65. doi:10.1017/S0031182012000522.

Medina, Jorge Mansur, Juliany Cola Fernandes Rodrigues, Otacilio C Moreira, Geórgia

Atella, Wanderley de Souza, and Hector Barrabin. 2015. “Mechanisms of Growth Inhibition of *Phytomonas Serpens* by the Alkaloids Tomatine and Tomatidine.”

Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz 110 (1): 48–55. doi:10.1590/0074-

02760140097.

Meier, Thomas, Alexander Krah, Peter J. Bond, Denys Pogoryelov, Kay Diederichs, and

José D. Faraldo-Gómez. 2009. “Complete Ion-Coordination Structure in the Rotor Ring of Na⁺-Dependent F-ATP Synthases.” *Journal of Molecular Biology* 391 (2):

498–507. doi:10.1016/j.jmb.2009.05.082.

Méndez, M.B., A. Goñi, W. Ramirez, and R.R. Grau. 2012. “Sugar Inhibits the

Production of the Toxins That Trigger Clostridial Gas Gangrene.” *Microbial*

Pathogenesis 52 (1): 85–91. doi:10.1016/j.micpath.2011.10.008.

Mitchell, Gabriel, Eric Brouillette, David Lalonde Séguin, Ann-Elise Asselin, Christian

Lebeau Jacob, and François Malouin. 2010. “A Role for Sigma Factor B in the Emergence of Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants and Elevated Biofilm Production Resulting from an Exposure to Aminoglycosides.” *Microbial Pathogenesis* 48 (1): 18–27. doi:10.1016/j.micpath.2009.10.003.

Mitchell, Gabriel, Alexandre Fugère, Karine Pépin Gaudreau, Eric Brouillette, Eric H Frost, André M Cantin, and François Malouin. 2013. “SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants.” *PloS One* 8 (5): e65018. doi:10.1371/journal.pone.0065018.

Mitchell, Gabriel, Mariza Gattuso, Gilles Grondin, Éric Marsault, Kamal Bouarab, and François Malouin. 2011. “Tomatidine Inhibits Replication of Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (5): 1937–45. doi:10.1128/AAC.01468-10.

Mitchell, Gabriel, Gilles Grondin, Ginette Bilodeau, André M Cantin, and François Malouin. 2011. “Infection of Polarized Airway Epithelial Cells by Normal and Small-Colony Variant Strains of Staphylococcus Aureus Is Increased in Cells with Abnormal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function and Is Influenced by NF- κ B.” *Infection and Immunity* 79 (9): 3541–51. doi:10.1128/IAI.00078-11.

Mitchell, Gabriel, Myriame Lafrance, Simon Boulanger, David Lalonde Séguin, Isabelle Guay, Mariza Gattuso, Eric Marsault, Kamal Bouarab, and François Malouin. 2012. “Tomatidine Acts in Synergy with Aminoglycoside Antibiotics against Multiresistant *Staphylococcus Aureus* and Prevents Virulence Gene Expression.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (3): 559–68. doi:10.1093/jac/dkr510.

Mitchell, Gabriel, Charles-Antoine Lamontagne, Eric Brouillette, Gilles Grondin, Brian G Talbot, Michel Grandbois, and François Malouin. 2008. “*Staphylococcus Aureus* SigB Activity Promotes a Strong Fibronectin-Bacterium Interaction Which May Sustain Host Tissue Colonization by Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients.” *Molecular Microbiology* 70 (6): 1540–55. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06511.x.

Mitchell, Gabriel, David Lalonde Séguin, Ann-Elise Asselin, Eric Déziel, André M Cantin, Eric H Frost, Sophie Michaud, and François Malouin. 2010. “*Staphylococcus Aureus* Sigma B-Dependent Emergence of Small-Colony Variants and Biofilm Production Following Exposure to *Pseudomonas Aeruginosa* 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline-N-Oxide.” *BMC Microbiology* 10 (January): 33. doi:10.1186/1471-2180-10-33.

Mitchell, Peter. 1961. “Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism.” *Nature* 191 (4784). Nature Publishing

Group: 144–48. doi:10.1038/191144a0.

Mitome, N., T. Suzuki, S. Hayashi, and M. Yoshida. 2004. “Thermophilic ATP Synthase Has a Decamer c-Ring: Indication of Noninteger 10:3 H⁺/ATP Ratio and Permissive Elastic Coupling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (33): 12159–64. doi:10.1073/pnas.0403545101.

Moisan, H., E. Brouillette, C. L. Jacob, P. Langlois-Begin, S. Michaud, and F. Malouin. 2006. “Transcription of Virulence Factors in *Staphylococcus Aureus* Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients Is Influenced by SigB.” *Journal of Bacteriology* 188 (1): 64–76. doi:10.1128/JB.188.1.64-76.2006.

Moreillon, P. 2008. “New and Emerging Treatment of *Staphylococcus Aureus* Infections in the Hospital Setting.” *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 3 (April): 32–41. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.01961.x.

Moreno, M S, B L Schneider, R R Maile, W Weyler, and M H Saier. 2001. “Catabolite Repression Mediated by the CcpA Protein in *Bacillus Subtilis*: Novel Modes of Regulation Revealed by Whole-Genome Analyses.” *Molecular Microbiology* 39 (5): 1366–81.

Nakanishi-Matsui, Mayumi, Mizuki Sekiya, and Masamitsu Futai. 2016. “ATP Synthase

from Escherichia Coli: Mechanism of Rotational Catalysis, and Inhibition with the ϵ Subunit and Phytopolyphenols.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857 (2): 129–40. doi:10.1016/j.bbabbio.2015.11.005.

Novick, Richard P. 2003. “Autoinduction and Signal Transduction in the Regulation of Staphylococcal Virulence.” *Molecular Microbiology* 48 (6): 1429–49.

Novick, Richard P, and Edward Geisinger. 2008. “Quorum Sensing in Staphylococci.” *Annual Review of Genetics* 42 (January): 541–64.
doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091640.

Nuxoll, Austin S, Steven M Halouska, Marat R Sadykov, Mark L Hanke, Kenneth W Bayles, Tammy Kielian, Robert Powers, and Paul D Fey. 2012. “CcpA Regulates Arginine Biosynthesis in Staphylococcus Aureus through Repression of Proline Catabolism.” *PLoS Pathogens* 8 (11): e1003033. doi:10.1371/journal.ppat.1003033.

O’Riordan, Katherine, and Jean C Lee. 2004. “Staphylococcus Aureus Capsular Polysaccharides.” *Clinical Microbiology Reviews* 17 (1): 218–34.

Oberfeld, Benjamin, Josef Brunner, and Peter Dimroth. 2006. “Phospholipids Occupy the Internal Lumen of the c Ring of the ATP Synthase of Escherichia Coli.” *Biochemistry* 45 (6): 1841–51. doi:10.1021/bi052304+.

- Ohta, S, M Yohda, M Ishizuka, H Hirata, T Hamamoto, Y Otawara-Hamamoto, K Matsuda, and Y Kagawa. 1988. "Sequence and over-Expression of Subunits of Adenosine Triphosphate Synthase in Thermophilic Bacterium PS3." *Biochimica et Biophysica Acta* 933 (1): 141–55.
- Onyango, Laura A., R. Hugh Dunstan, Johan Gottfries, Christof von Eiff, and Timothy K. Roberts. 2012. "Effect of Low Temperature on Growth and Ultra-Structure of Staphylococcus Spp." Edited by Dipshikha Chakravorty. *PLoS ONE* 7 (1): e29031. doi:10.1371/journal.pone.0029031.
- Otto, T. D., G. P. Dillon, W. S. Degrave, and M. Berriman. 2011. "RATT: Rapid Annotation Transfer Tool." *Nucleic Acids Research* 39 (9): e57–e57. doi:10.1093/nar/gkq1268.
- Pérez-Espinosa, A, T Roldán-Arjona, and M Ruiz-Rubio. 2001. "Pantothenate Synthetase from Fusarium Oxysporum F. Sp. Lycopersici Is Induced by Alpha-Tomatine." *Molecular Genetics and Genomics* : MGG 265 (5): 922–29.
- Petrella, Stephanie, Emmanuelle Cambau, Aurelie Chauffour, Koen Andries, Vincent Jarlier, and Wladimir Sougakoff. 2006. "Genetic Basis for Natural and Acquired Resistance to the Diarylquinoline R207910 in Mycobacteria." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2853–56. doi:10.1128/AAC.00244-06.

- Pogoryelov, Denys, Adriana L Klyszejko, Ganna O Krasnoselska, Eva-Maria Heller, Vanessa Leone, Julian D Langer, Janet Vonck, Daniel J Müller, José D Faraldo-Gómez, and Thomas Meier. 2012. “Engineering Rotor Ring Stoichiometries in the ATP Synthase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (25): E1599-608. doi:10.1073/pnas.1120027109.
- Preiss, L., J. D. Langer, O. Yildiz, L. Eckhardt-Strelau, J. E. G. Guillemont, A. Koul, and T. Meier. 2015. “Structure of the Mycobacterial ATP Synthase Fo Rotor Ring in Complex with the Anti-TB Drug Bedaquiline.” *Science Advances* 1 (4): e1500106–e1500106. doi:10.1126/sciadv.1500106.
- Preiss, Laura, Julian D Langer, David B Hicks, Jun Liu, Ozkan Yildiz, Terry A Krulwich, and Thomas Meier. 2014. “The c-Ring Ion Binding Site of the ATP Synthase from *Bacillus Pseudofirmus* OF4 Is Adapted to Alkaliphilic Lifestyle.” *Molecular Microbiology* 92 (5): 973–84. doi:10.1111/mmi.12605.
- Preiss, Laura, Özkan Yildiz, David B. Hicks, Terry A. Krulwich, Thomas Meier, W Junge, H Sielaff, et al. 2010. “A New Type of Proton Coordination in an F1Fo-ATP Synthase Rotor Ring.” Edited by John Kuriyan. *PLoS Biology* 8 (8). Public Library of Science: e1000443. doi:10.1371/journal.pbio.1000443.
- Proctor, Richard A., Christof von Eiff, Barbara C. Kahl, Karsten Becker, Peter McNamara, Mathias Herrmann, and Georg Peters. 2006a. “Small Colony Variants:

A Pathogenic Form of Bacteria That Facilitates Persistent and Recurrent Infections.”

Nature Reviews Microbiology 4 (4): 295–305. doi:10.1038/nrmicro1384.

Proctor, Richard A, Christof von Eiff, Barbara C Kahl, Karsten Becker, Peter McNamara, Mathias Herrmann, and Georg Peters. 2006b. “Small Colony Variants: A Pathogenic Form of Bacteria That Facilitates Persistent and Recurrent Infections.” *Nature Reviews. Microbiology* 4 (4): 295–305. doi:10.1038/nrmicro1384.

Rao, S. P. S., S. Alonso, L. Rand, T. Dick, and K. Pethe. 2008. “The Protonmotive Force Is Required for Maintaining ATP Homeostasis and Viability of Hypoxic, Nonreplicating Mycobacterium Tuberculosis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (33): 11945–50. doi:10.1073/pnas.0711697105.

Sabra, W, A M Haddad, and A-P Zeng. 2014. “Comparative Physiological Study of the Wild Type and the Small Colony Variant of Pseudomonas Aeruginosa 20265 under Controlled Growth Conditions.” *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 30 (3): 1027–36. doi:10.1007/s11274-013-1521-z.

Saier, M H. 1991. “A Multiplicity of Potential Carbon Catabolite Repression Mechanisms in Prokaryotic and Eukaryotic Microorganisms.” *The New Biologist* 3 (12): 1137–47.

Saier, M H, S Chauvaux, J Deutscher, J Reizer, and J J Ye. 1995. “Protein

Phosphorylation and Regulation of Carbon Metabolism in Gram-Negative versus Gram-Positive Bacteria.” *Trends in Biochemical Sciences* 20 (7): 267–71.

Sambongi, Yoshihiro, Yuko Iko, Mikio Tanabe, Hiroshi Omote, Atsuko Iwamoto-Kihara, Ikuo Ueda, Toshio Yanagida, Yoh Wada, and Masamitsu Futai. 1999. “Mechanical Rotation of the c Subunit Oligomer in ATP Synthase (F₀F₁): Direct Observation.” *Science* 286 (5445).

Santana, M, M S Ionescu, A Vertes, R Longin, F Kunst, A Danchin, and P Glaser. 1994. “Bacillus Subtilis F₀F₁ ATPase: DNA Sequence of the Atp Operon and Characterization of Atp Mutants.” *Journal of Bacteriology* 176 (22): 6802–11.

Santos, Victor, and Irvin Hirshfield. 2016. “The Physiological and Molecular Characterization of a Small Colony Variant of Escherichia Coli and Its Phenotypic Rescue.” *PloS One* 11 (6): e0157578. doi:10.1371/journal.pone.0157578.

Schumacher, Maria A, Gerald Seidel, Wolfgang Hillen, and Richard G Brennan. 2007. “Structural Mechanism for the Fine-Tuning of CcpA Function by the Small Molecule Effectors Glucose 6-Phosphate and Fructose 1,6-Bisphosphate.” *Journal of Molecular Biology* 368 (4): 1042–50. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.054.

Schumacher, Maria A, Mareen Sprehe, Maike Bartholomae, Wolfgang Hillen, and Richard G Brennan. 2011. “Structures of Carbon Catabolite Protein A-(HPr-Ser46-

P) Bound to Diverse Catabolite Response Element Sites Reveal the Basis for High-Affinity Binding to Degenerate DNA Operators.” *Nucleic Acids Research* 39 (7): 2931–42. doi:10.1093/nar/gkq1177.

Segala, Elena, Wladimir Sougakoff, Aurelie Nevejans-Chauffour, Vincent Jarlier, and Stephanie Petrella. 2012. “New Mutations in the Mycobacterial ATP Synthase: New Insights into the Binding of the Diarylquinoline TMC207 to the ATP Synthase C-Ring Structure.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (5): 2326–34. doi:10.1128/AAC.06154-11.

Seggewiss, Jochen, Karsten Becker, Oliver Kotte, Martin Eisenacher, Mohammad Reza Khoschkhoy Yazdi, Andreas Fischer, Peter McNamara, et al. 2006. “Reporter Metabolite Analysis of Transcriptional Profiles of a Staphylococcus Aureus Strain with Normal Phenotype and Its Isogenic hemB Mutant Displaying the Small-Colony-Variant Phenotype.” *Journal of Bacteriology* 188 (22): 7765–77. doi:10.1128/JB.00774-06.

Seidel, Gerald, Marco Diel, Norbert Fuchsbauer, and Wolfgang Hillen. 2005. “Quantitative Interdependence of Coeffectors, CcpA and Cre in Carbon Catabolite Regulation of Bacillus Subtilis.” *FEBS Journal* 272 (10). Blackwell Science Ltd: 2566–77. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04682.x.

Seidl, Kati, Markus Bischoff, and Brigitte Berger-Bächi. 2008. “CcpA Mediates the

Catabolite Repression of Tst in Staphylococcus Aureus.” *Infection and Immunity* 76 (11): 5093–99. doi:10.1128/IAI.00724-08.

Seidl, Kati, Christiane Goerke, Christiane Wolz, Dietrich Mack, Brigitte Berger-Bächi, and Markus Bischoff. 2008. “Staphylococcus Aureus CcpA Affects Biofilm Formation.” *Infection and Immunity* 76 (5): 2044–50. doi:10.1128/IAI.00035-08.

Seidl, Kati, Susanne Müller, Patrice François, Carsten Kriebitzsch, Jacques Schrenzel, Susanne Engelmann, Markus Bischoff, and Brigitte Berger-Bächi. 2009. “Effect of a Glucose Impulse on the CcpA Regulon in Staphylococcus Aureus.” *BMC Microbiology* 9 (January): 95. doi:10.1186/1471-2180-9-95.

Seidl, Kati, Martin Stucki, Martin Ruegg, Christiane Goerke, Christiane Wolz, Llinos Harris, Brigitte Berger-Bächi, and Markus Bischoff. 2006. “Staphylococcus Aureus CcpA Affects Virulence Determinant Production and Antibiotic Resistance.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (4): 1183–94. doi:10.1128/AAC.50.4.1183-1194.2006.

Sendi, Parham, and Richard A Proctor. 2009. “Staphylococcus Aureus as an Intracellular Pathogen: The Role of Small Colony Variants.” *Trends in Microbiology* 17 (2): 54–58. doi:10.1016/j.tim.2008.11.004.

Silver, Lynn L. 2011. “Challenges of Antibacterial Discovery.” *Clinical Microbiology*

Reviews 24 (1): 71–109. doi:10.1128/CMR.00030-10.

Singh, Kalpana D, Matthias H Schmalisch, Jörg Stülke, and Boris Görke. 2008. “Carbon Catabolite Repression in *Bacillus Subtilis*: Quantitative Analysis of Repression Exerted by Different Carbon Sources.” *Journal of Bacteriology* 190 (21). American Society for Microbiology (ASM): 7275–84. doi:10.1128/JB.00848-08.

Singh, Rachna, Pallab Ray, Anindita Das, and Meera Sharma. 2009. “Role of Persisters and Small-Colony Variants in Antibiotic Resistance of Planktonic and Biofilm-Associated *Staphylococcus Aureus*: An in Vitro Study.” *Journal of Medical Microbiology* 58 (Pt 8): 1067–73. doi:10.1099/jmm.0.009720-0.

Somerville, Greg A, and Richard A Proctor. 2009. “At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in *Staphylococci*.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 73 (2): 233–48. doi:10.1128/MMBR.00005-09.

Sonenshein, Abraham L. 2007. “Control of Key Metabolic Intersections in *Bacillus Subtilis*.” *Nature Reviews. Microbiology* 5 (12). Nature Publishing Group: 917–27. doi:10.1038/nrmicro1772.

Stanley, Nicola R, Robert A Britton, Alan D Grossman, and Beth A Lazazzera. 2003. “Identification of Catabolite Repression as a Physiological Regulator of Biofilm Formation by *Bacillus Subtilis* by Use of DNA Microarrays.” *Journal of*

Bacteriology 185 (6): 1951–57.

Stock, Daniela, Andrew G. W. Leslie, and John E. Walker. 1999. “Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase.” *Science* 286 (5445).

Talbot, George H, John Bradley, John E Edwards, David Gilbert, Michael Scheld, and John G Bartlett. 2006. “Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America.” *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 42 (5): 657–68. doi:10.1086/499819.

Tassew, Haimanot, Alemseged Abdissa, Getenet Beyene, and Solomon Gebre-Selassie. 2010. “Microbial Flora and Food Borne Pathogens on Minced Meat and Their Susceptibility to Antimicrobial Agents.” *Ethiopian Journal of Health Sciences* 20 (3): 137–43.

Tobisch, S, D Zühlke, J Bernhardt, J Stülke, and M Hecker. 1999. “Role of CcpA in Regulation of the Central Pathways of Carbon Catabolism in *Bacillus Subtilis*.” *Journal of Bacteriology* 181 (22): 6996–7004.

Tran, S. L., and G. M. Cook. 2005. “The F₁F_o-ATP Synthase of *Mycobacterium Smegmatis* Is Essential for Growth.” *Journal of Bacteriology* 187 (14): 5023–28. doi:10.1128/JB.187.14.5023-5028.2005.

- Tuchscherr, Lorena, Eva Medina, Muzaffar Hussain, Wolfgang Völker, Vanessa Heitmann, Silke Niemann, Dirk Holzinger, et al. 2011. “Staphylococcus Aureus Phenotype Switching: An Effective Bacterial Strategy to Escape Host Immune Response and Establish a Chronic Infection.” *EMBO Molecular Medicine* 3 (3): 129–41. doi:10.1002/emmm.201000115.
- van der Voort, Menno, Oscar P Kuipers, Girbe Buist, Willem M de Vos, and Tjakko Abee. 2008. “Assessment of CcpA-Mediated Catabolite Control of Gene Expression in *Bacillus Cereus* ATCC 14579.” *BMC Microbiology* 8 (1): 62. doi:10.1186/1471-2180-8-62.
- Varga, J., V. L. Stirewalt, and S. B. Melville. 2004. “The CcpA Protein Is Necessary for Efficient Sporulation and Enterotoxin Gene (Cpe) Regulation in *Clostridium Perfringens*.” *Journal of Bacteriology* 186 (16): 5221–29. doi:10.1128/JB.186.16.5221-5229.2004.
- Varga, John J, Blair Therit, and Stephen B Melville. 2008. “Type IV Pili and the CcpA Protein Are Needed for Maximal Biofilm Formation by the Gram-Positive Anaerobic Pathogen *Clostridium Perfringens*.” *Infection and Immunity* 76 (11). American Society for Microbiology (ASM): 4944–51. doi:10.1128/IAI.00692-08.
- Vázquez-Boland, J A, M Kuhn, P Berche, T Chakraborty, G Domínguez-Bernal, W

- Goebel, B González-Zorn, J Wehland, and J Kreft. 2001. “Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants.” *Clinical Microbiology Reviews* 14 (3): 584–640. doi:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
- von Ballmoos, Christoph, Gregory M Cook, and Peter Dimroth. 2008. “Unique Rotary ATP Synthase and Its Biological Diversity.” *Annual Review of Biophysics* 37 (January): 43–64. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.130018.
- von Ballmoos, Christoph, Alexander Wiedenmann, and Peter Dimroth. 2009. “Essentials for ATP Synthesis by F1F0 ATP Synthases.” *Annual Review of Biochemistry* 78 (January): 649–72. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.104803.
- von Meyenburg, K, B B Jørgensen, J Nielsen, and F G Hansen. 1982. “Promoters of the Atp Operon Coding for the Membrane-Bound ATP Synthase of Escherichia Coli Mapped by Tn10 Insertion Mutations.” *Molecular & General Genetics : MGG* 188 (2): 240–48.
- Walker, J E, N J Gay, M Saraste, and A N Eberle. 1984. “DNA Sequence around the Escherichia Coli Unc Operon. Completion of the Sequence of a 17 Kilobase Segment Containing asnA, oriC, Unc, glmS and phoS.” *The Biochemical Journal* 224 (3). Portland Press Ltd: 799–815.
- Walker, John E. 2013. “The ATP Synthase: The Understood, the Uncertain and the

Unknown.” *Biochemical Society Transactions* 41 (1).

Watt, I. N., M. G. Montgomery, M. J. Runswick, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker.

2010. “Bioenergetic Cost of Making an Adenosine Triphosphate Molecule in Animal Mitochondria.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (39): 16823–27. doi:10.1073/pnas.1011099107.

Wolter, Daniel J, Julia C Emerson, Sharon McNamara, Anne M Buccat, Xuan Qin,

Elizabeth Cochrane, Laura S Houston, et al. 2013. “Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants Are Independently Associated with Worse Lung Disease in Children with Cystic Fibrosis.” *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 57 (3): 384–91. doi:10.1093/cid/cit270.

Woodford, N, and M J Ellington. 2007. “The Emergence of Antibiotic Resistance by

Mutation.” *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13 (1): 5–18. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x.

Yagi, Hiromasa, Nobumoto Kajiwara, Hideaki Tanaka, Tomitake Tsukihara, Yasuyuki

Kato-Yamada, Masasuke Yoshida, and Hideo Akutsu. 2007. “Structures of the Thermophilic F1-ATPase Epsilon Subunit Suggesting ATP-Regulated Arm Motion of Its C-Terminal Domain in F1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*

of the United States of America 104 (27). National Academy of Sciences: 11233–38.
doi:10.1073/pnas.0701045104.

Yarwood, Jeremy M, and Patrick M Schlievert. 2003. “Quorum Sensing in
Staphylococcus Infections.” *The Journal of Clinical Investigation* 112 (11).
American Society for Clinical Investigation: 1620–25. doi:10.1172/JCI20442.

Yasbin, R E, and F E Young. 1974. “Transduction in Bacillus Subtilis by Bacteriophage
SPP1.” *Journal of Virology* 14 (6). American Society for Microbiology (ASM):
1343–48.

Zomer, A. L., G. Buist, R. Larsen, J. Kok, and O. P. Kuipers. 2007. “Time-Resolved
Determination of the CcpA Regulon of Lactococcus Lactis Subsp. Cremoris
MG1363.” *Journal of Bacteriology* 189 (4): 1366–81. doi:10.1128/JB.01013-06.

CHAPITRE 3 : CONFIRMER LA CIBLE DE LA TOMATIDINE ET DÉRIVÉS

3.1 Mutagenèse : association entre les mutations dans *atpE* et la résistance

3.1.1 Complémentation du gène *atpE* chez *S. aureus* SCV

L'induction de souches de *S. aureus* SCV par pression sélective de tomatidine ou du dérivé FC04-100, a permis l'identification de mutations ponctuelles (A17S, G18C, S26L et F47L) dans le gène *atpE*. Ces mutations ont été associées à la résistance à la tomatidine et FC04-100 (stéréoisomères FcM et Fcm). Le but est de confirmer l'association entre ces mutations et la résistance pour les composés par clonage. Dans un premier temps, le gène *atpE* de type sauvage ou portant les différentes mutations (A17S, G18C, S26L et F47L) sera surexprimer par un promoteur constitutif (*PblaZ*) dans un plasmide (pour les Gram positifs) de répllication à plusieurs copies chez *S. aureus* Newbould $\Delta hemB$ (SCV stable sensible à la tomatidine et FC04-100). Ainsi, le SCV recombinant avec le plasmide portant le gène *atpE* avec l'une des quatre mutations va surexprimé la sous-unité c mutante et devrait donc devenir résistant à la tomatine et FC04-100. Il est à noter que la souche SCV portant le plasmide va exprimer également la sous-unité c de type sauvage encodée par son gène *atpE* génomique, ainsi il est possible que le niveau de résistance soit variable. Le plasmide vide ainsi que le plasmide portant l'*atpE* de type sauvage seront utilisés comme contrôle où le premier va permettre d'indiquer que le plasmide en tant que tel n'a pas d'effet et le deuxième pour indiquer si la surexpression de l'*atpE* de type sauvage a un effet. Il est à noter que *S. aureus* Newbould $\Delta hemB$ est obtenu par insertion de la cassette de résistance à l'érythromycine.

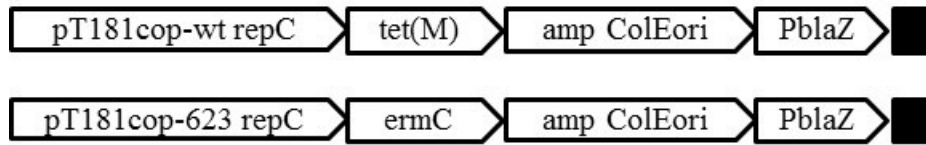
3.1.1.1 Préparation des plasmides

Le plasmide utilisé (pCN36-HighCopie-PblaZ; pCN36-HC-PblaZ) est dérivé des plasmides pour bactéries Gram-positives (Charpentier et al. 2004), pCN36-PblaZ (lui-même dérivé de pCN36 par insertion de la cassette contenant le promoteur *PblaZ* devant le site de clonage multiple, par Julie Côté-Gravel de notre laboratoire) et pCN43 (figure

1A). Le plasmide pCN36-HC-PblaZ possède une origine de réplication pour Gram positif mutante (pT181cop-623 repC) menant à plusieurs copies du plasmide, une cassette de résistance à la tétracycline pour la sélection chez les Gram positif, une origine de réplication chez *E. coli* contenant un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection chez celui-ci, un promoteur constitutif fort (*PblaZ*) et un site de clonage multiple (Figure 1B). L'origine de réplication pT181cop-623 repC provient du plasmide pCN43 par digestion avec AvrII et NarI. pCN36-PblaZ et pCN43 ont été digérés avec ces deux enzymes de restrictions et migrés sur gel afin de séparer les fragments. Les fragments digérés de pCN36-PblaZ sans l'origine de réplication pT181cop-wt repC et l'origine de réplication mutante de pCN43 ont été extraits du gel via le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Suite à l'extraction d'ADN à partir de gel d'agarose, les fragments ont été liés avec la T4 ligase de la compagnie NEB suivant leurs recommandations. Le gène *atpE* des souches Newbould $\Delta hemB$ de type sauvage, SaR1-1 (mutation A17S), SaR4-1 (mutation S26L), SaR5-1 (mutation G18C) et SaR6-1 (mutation F47L) a été amplifié par PCR avec la polymérase Q5 (NEB), suivant leurs recommandations. Les amorces utilisées sont Surexp-atpE-fwd (5'nnnnGGATCC**aggaggaa**attaaattatgaatttaac), contenant le *ribosome binding site* naturel du gène (en gras) et le site de restriction de BamHI (en majuscule), et Surexp-atpE-rev (nnnnGAATTCttatccagcaaatgtcatg), contenant le site de restriction de EcoRI (en majuscule). Ces deux sites de restrictions se retrouvent dans le site de clonage multiple du plasmide. Ainsi les différents fragments du gène *atpE* de type sauvage ou mutants et pCN36-HC-PblaZ sont digérés avec ces deux enzymes de restriction. Par la suite les fragments digérés sont liés (avec la T4 ligase) dans le plasmide digéré, menant aux plasmides : pCN36-HC-pBlaZ-atpE-wt (type sauvage), pCN36-HC-pBlaZ-atpER1, pCN36-HC-pBlaZ-atpER4, pCN36-HC-pBlaZ-atpER5 et pCN36-HC-pBlaZ-atpER6. Les plasmides sont répliqués par transformation par choc thermique dans *E. coli* DH5 α (protocole fourni par PGC Scientifics Corporation). Les souches portant les plasmides sont congelées dans notre souchier sous les noms DH5 α pCN36-HC-PblaZ vide, DH5 α pCN36-HC-PblaZ-atpEwt et ainsi de suite. Le gène *atpE* de ces plasmides a été envoyé à séquencer au centre de recherche du CHUL (service de plateforme de séquençage et géotypage des

génomés), confirmant que chaque plasmide possède le gène *atpE* de type sauvage ou mutant correspondant.

A



B

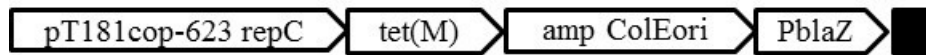


Figure 1. Schématisation des plasmides utilisés pour la surexpression du gène *atpE* chez *S. aureus* SCV. (A) Cassettes contenues dans pCN36 et pCN43 respectivement, où le carré noir représente le site de clonage multiple. (B) Cassettes contenues dans pCN36-HC-PblaZ, où le carré noir représente le site de clonage multiple. Figure modifiée de Charpentier *et al.* (2004).

3.1.1.2 Transformation du SCV

Les plasmides obtenus (ainsi que pCN36-HC-PblaZ vide) sont ensuite transformés dans la souche de laboratoire *S. aureus* RN4220 (sans système de restriction digérant l'ADN exogène) par l'obtention de cellules compétentes et transformation de celles-ci par électroporation (Löfblom *et al.* 2007). Brièvement, RN4220 est cultivé dans un milieu minimal (caséine hydrolysée 1%, extrait de levure 2,5%, Glucose 0,5%, NaCl 2,5%, K₂HPO₄ 0,1% et pH ajusté à 7,5), centrifugé et suspendu (eau stérile froide, eau stérile avec glycérol 5% ou 10%) en série. La transformation avec les plasmides se fait par électroporation avec l'appareil (MicroPulser, Bio-Rad), les cuvettes d'électroporation de 2 mm (MB5520; Fisher), une bonne quantité de plasmide (entre 1 et 4 µg) et les conditions suivantes : 25 µF, 100 Ohm et 2,0 kV. Les transformants sont isolés par sélection sur géloses TSA avec 10 µg/ml de tétracycline.

Les plasmides provenant de DH5 α et de RN4220 sont extraits à l'aide du kit d'extraction d'ADN plasmidique QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Dans le cas de *S. aureus*, le protocole est modifié par incubation du culot de bactérie 1h à 35°C avec 45 mg/ml de lysozyme et 200 μ g/ml de lysostaphine avant d'entamer la lyse alcaline, afin de fragiliser un maximum la paroi de *S. aureus*. Les cellules compétentes de Newbould Δ *hemB* sont obtenues de la même façon que pour RN4220. Le protocole de transformation par électroporation est légèrement modifié où le voltage est augmenté (2,8 kV). Jusqu'à présent, *S. aureus* SCV portant pCN36-HC-PblaX-atpER4 a été obtenu.

3.1.1.3 Tests de CMI

Afin d'évaluer leur résistance, les mutants de surexpression (Newbould Δ *hemB* portant les différentes constructions de plasmide) seront testés en CMI avec la tomatidine, les deux formes de FC04-100 et la gentamicine. À présent, Newbould Δ *hemB* pCN36-HC-PblaZ-atpER4 (mutation S26L) a été obtenu et il présente un profil de susceptibilité similaire à SaR4-1 (portant la mutation dans son *atpE* génomique), voir tableau 1.

Tableau 1. Susceptibilité à la tomatidine, FC04-100 et à la gentamicine pour *S. aureus* SCV exprimant la sous-unité c de type sauvage ou mutante (S26L).

Souches	CMI (μ g/ml)			
	TO ¹	FcM ¹	Fcm ¹	Gen ¹
<i>S. aureus</i> Newbould Δ HemB ²	0,03-0,125	0,03-0,125	2	8
Newbould Δ HemB SaR4 ³	>16	2	8	8
Newbould Δ HemB pCN36 R4 ⁴	>16	8	16	0.5-2-8

¹TO : tomatidine, FcM : FC-majeur, Fcm : FC-mineur, Gen : gentamicine.

²SCV stable sensible à la tomatidine et dérivés.

³SCV stable résistant à la tomatidine (*atpE* génomique S26L)

⁴SCV stable portant le plasmide pCN36-HC-PblaZ-atpER4

3.1.2 Remplacement allélique du gène *atpE* chez *B. subtilis*

B. subtilis est une espèce cible de la tomatidine et dérivés. Tel que l'on peut le voir à la figure 5 de l'article scientifique du chapitre 2, la sous-unité c est très conservée au travers des *Bacillales*, incluant les résidus retrouvés mutés chez les isolats résistants. De plus, les manipulations génétiques sont beaucoup plus aisées chez *B. subtilis*, qui est naturellement compétant. Ainsi, nous construirons quatre souches de *B. subtilis* dans lesquelles l'allèle sauvage du gène *atpE* sera remplacé par une version mutante correspondant aux mutations retrouvées chez *S. aureus*. Le gène *atpE* de type sauvage, contenu dans un grand fragment d'environ 1000 paires de bases sera incorporé dans un plasmide thermosensible pour *B. subtilis*, répliqué à l'aide d'un kit de mutagenèse dirigée afin d'obtenir quatre plasmides (chacun avec l'une des mutations différentes retrouvées chez les Newbould $\Delta hemB$ résistants). Suivant l'obtention des changements alléliques, il y aura délétion du gène *hemB* afin de rendre les isolats SCV. Ces isolats de *B. subtilis* SCV contenant l'une des quatre mutations dans l'*atpE* devraient devenir résistants à la tomatidine et à FC04-100, soutenant l'hypothèse que les séquences conservées dans la sous-unité c expliquent en partie la spécificité pour les *Bacillales*.

3.1.2.1 Préparations des plasmides

Le plasmide utilisé est pMiniMad2 (Konkol, Blair, and Kearns 2013), provenant de pMiniMad (Arnaud, Chastanet, and Débarbouillé 2004). Il possède une origine de répllication pour *E. coli* avec gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection chez celui-ci, une origine de répllication thermosensible pour Gram positif, un gène de résistance aux macrolides-lincosamides-streptogramines (MLS) *ermR* et le site de clonage multiple (figure 2). Le gène *atpE* de type sauvage de *B. subtilis* str. 168 plus 500 paires de bases avant et après est amplifié par PCR avec la polymérase Q5 et les amorces Bs-atpE500ds-fwd (NNNNGGATCCtgccgttctctattacaatcgg, incluant en majuscule le site de restriction de BamH1) et Bs-atpE500us-rev (NNNNGAATTCtctttcagacgttcagattctgc, incluant en majuscule le site de restriction de EcoR1). Ce fragment et pMiniMad2 sont digérés avec BamH1 et EcoR1, puis liés via leurs extrémités cohésives par la ligase T4. Le plasmide

obtenu, pMiniMad2-BsatpE, est répliqué par transformation par choc thermique dans *E. coli* DH5 α (congelé dans notre souchier).

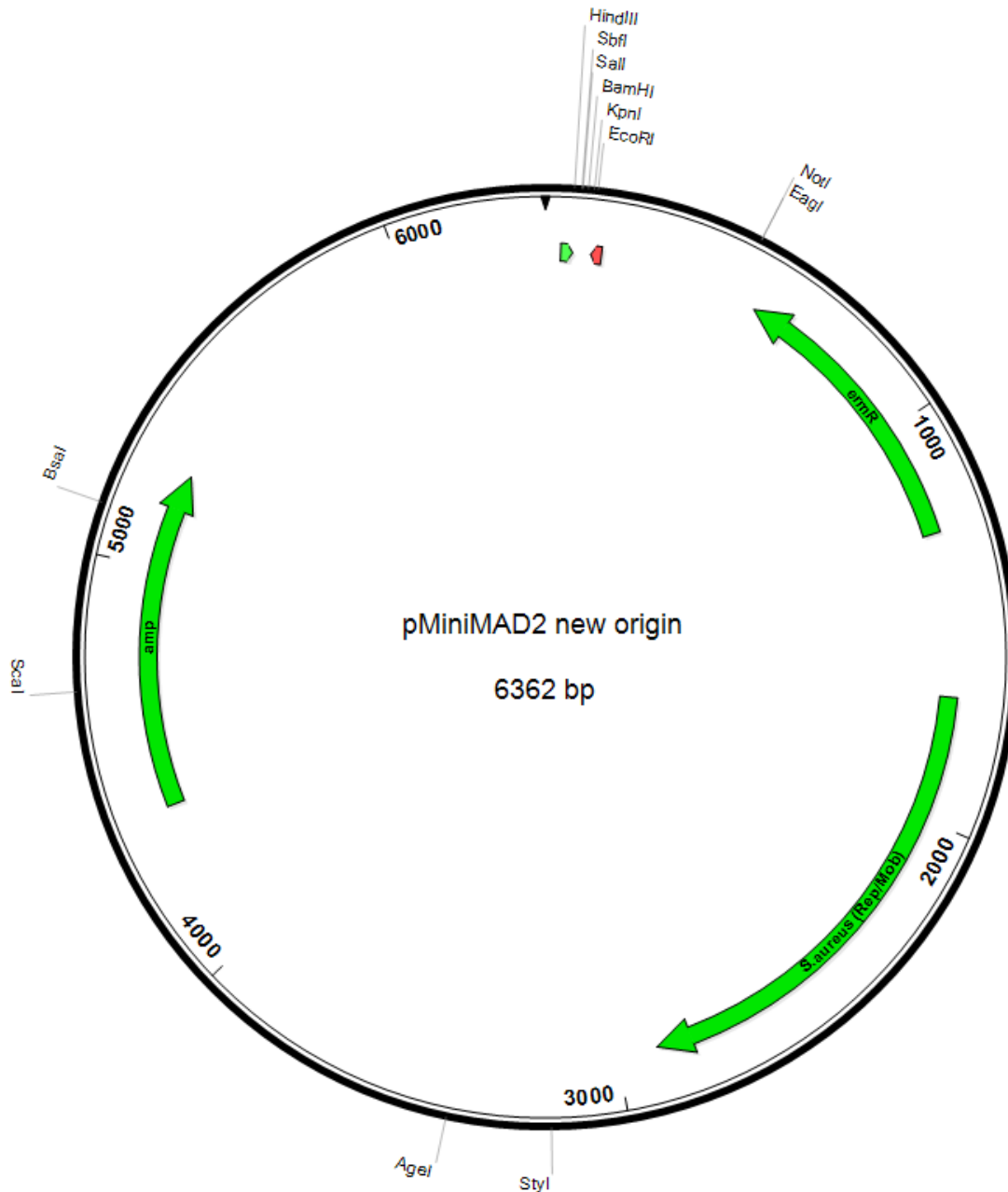


Figure 2. Schématisation des cassettes contenues dans le plasmide pMinimad2, figure modifiée de Konkol *et al.* (2013).

Afin d'obtenir les quatre plasmides contenant chacune une des mutations retrouvées chez *S. aureus* SCV résistants à la tomatidine et dérivés, pMiniMad2-BsatpE est répliqué à l'aide d'un kit de mutagenèse dirigée adapté pour le clonage de gros plasmide (QuickChange II

XL Site-Directed Muagenesis kit, Agilent). Le principe consiste à répliquer le plasmide avec une paire d'amorces de séquence complémentaire et inversée (sens et anti-sens) contenant une base substituée (par la base mutée retrouvée chez *S. aureus* résistant) au milieu, permettant ainsi la réplication du plasmide avec une base substituée dans le gène *atpE*. Le produit de réplication est ensuite digéré avec la Dpn1, nucléase digérant l'ADN portant des marques de méthylation, permettant la dégradation du brin mère ayant des marques de méthylations dues à sa réplication dans DH5 α . On obtient ainsi, seulement le plasmide mutant que l'on réplique dans des cellules compétentes fournit par le kit. Le tableau 2 contient les amorces utilisées. Les plasmides obtenus portent les noms de pMiniMad2-BsatpEmut1, pMiniMad2-BsatpEmut2, pMiniMad2-BsatpEmut3 et pMiniMad2-BsatpEmut4 (mut1 = A17S; mut2 = G18C; mut3 = S26L; mut4 = F47L) et sont congelés dans notre souchier. La séquence du gène *atpE* a été vérifiée par séquençage de ceux-ci via le centre de recherche du CHUL (service de plateforme de séquençage et génotypage des génomes).

Tableau 2. Listes des amorces pour répliquer le plasmide pMiniMad2-BsatpE avec le kit de mutagenèse dirigée de Agilent.

Amorces	Séquence (5'→3')	Mutation
Bs-atpEmut1-fwd	ggtttaggcgcacttggtcaggtattggtaacggtt	G49T(AS17)
Bs-atpEmut1-rev	aaccgttaccaatacctgaaccaagtgcgcctaaacc	G49T(AS17)
Bs-atpEmut2-fwd	ggtttaggcgcacttggtgcatgtattggtaacggttgattg	G52T(G18C)
Bs-atpEmut2-rev	caatcaaaccgttaccaatacatgcaccaagtgcgcctaaacc	G52T(G18C)
Bs-atpEmut3-fwd	gtaacggtttgattgttttacgtacggtagaggggattg	C77T(S26L)
Bs-atpEmut3-rev	caatcccctctaccgtacgtaaaacaatcaaaccgttac	C77T(S26L)
Bs-atpEmut4-fwd	gaactgagaactcttatgctcatgggtatcgattag	T139C(F47L)
Bs-atpEmut4-rev	ctaatgcgatacccatgagcataagagttctcagttc	T139C(F47L)

3.1.2.2 Transformation de *B. subtilis*

Les plasmides sont introduits dans *B. subtilis* str. 168 par compétence naturelle de celle-ci. La souche est cultivée dans un milieu minimal avec 3 mM de MgSO₄, 0,05 mg/ml de

phénylalanine et 0,02 mg/ml de tryptophane (la souche est auxotrophe pour ces deux acides aminés). Le milieu minimal est obtenu par une dilution 1/10 du milieu minimal concentré dans de l'eau (pour 1 L : 26,20 g de KH_2PO_4 , 53,56 g de K_2HPO_4 , 100 g de D-glucose, 5 g de « casamino acids », 10 g de L-glutamate « monopotassium salt », 50 mL de citrate de sodium 300 mM et 5 mL de citrate d'ammonium ferrique 22 mg/mL). Suite à la croissance de la souche, celle-ci est incubée en présence du plasmide et étalée sur gélose (LBA) contenant du MLS 1x (MLS 1000X = 100 mL 50% éthanol, 100 mg érythromycine et 2,5 g de lincomycine). L'incubation se fait à 37°C empêchant la réplication du plasmide chez *B. subtilis* en raison de l'origine de réplication thermosensible. Cela force la bactérie à intégrer le plasmide dans son génome via la séquence homologue afin d'exprimer le gène de résistance au MLS. Ensuite, une colonie est cultivée durant quelques séries dans du LB à 22°C sans antibiotique, permettant l'excision du plasmide du génome. Cette excision s'effectuant par recombinaison homologue mènera dans la moitié des cas à la conservation du gène de type sauvage provenant du génome, et dans l'autre moitié des cas le gène *atpE* provenant du plasmide sera conservé. Les colonies ayant effectué l'excision sont sélectionnées par la perte de la résistance au mls. Le gène *atpE* de ces souches potentielles est amplifié par PCR et envoyé séquencé au centre de recherche du CHUL (service de plateforme de séquençage et génotypage des génomes). Nous sommes présentement en attente de ces résultats. Pour chaque site de mutation, la souche correspondante devrait s'appeler Bs 168 atpEmut1, Bs 168 atpEmut2, Bs 168 atpEmut3 et Bs 168 atpEmut4.

3.1.2.3 Délétion du gène *hemB*

Suite à l'obtention des isolats avec un site de mutation dans l'*atpE*, ceux-ci devront subir une délétion dans le gène *hemB* afin de les rendre SCV. La technique utilisée sera la transduction par le phage SPP1 d'une souche donneuse (*B. subtilis* str. 168 Δ *hemB*, provenant du Bacillus Genetic Stock Center) à une souche réceptrice (*B. subtilis* atpEmut1-2-3-4)(Yasbin and Young 1974). Le protocole qui sera utilisée est optimisé par Pr. Pascale B. Beauregard de l'Université de Sherbrooke. La souche donneuse est cultivée durant 3h (DO entre 1,0-1,5; fin de la phase logarithmique ou début de la phase stationnaire) dans un milieu TY (pour 1 L : 10 g de tryptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g de NaCl, 10 mM de

MgSO₄, 100 µM de MnSO₄ et pH ajusté à 7,2). La souche donneuse sera ensuite infectée avec différentes dilutions (10⁻⁴ à 10⁻⁶) du stock de phage SPP1. De l'agar mou préchauffé (TY + 0,5% d'agar) est ajouté et ensuite étalé sur une gélose TY. Suite à une incubation à température pièce jusqu'au lendemain, des plages de lyses (phages ayant fait leur cycle de réplication lytique) devraient être visibles sur les pétris. Le pétris avec le plus de plages de lyse non confluentes (il doit rester des zones avec bactéries) sera sélectionné pour la récupération des phages. L'agar du dessus est récupéré avec du milieu TY, brisé afin de récupérer les phages et retiré par centrifugation. Ce nouveau stock de phage contient des fragments du génomes de la souche donneuse dans leur capside, dont le fragment contenant le gène *hemB* est remplacé par le gène de résistance au MLS. Ce stock de phage est traité à la DNase, filtré et du chloroforme est ajouté pour éliminer les contaminants. Le processus de culture sera répété avec souche donneuse et celle-ci sera infectée avec le nouveau stock de phage durant un certain temps. Les bactéries sont récupérées par centrifugation, suspendues dans le restant de surnageant non enlevé et étalées sur pétris contenant l'antibiotique (MLS 1x) et 10 mM de citrate (le citrate capte le magnésium et le manganèse empêchant le virus de faire son cycle lytique). Suite à l'incubation, des colonies devraient être visibles sur pétris (ayant recombinaison le fragment *hemB* remplacé par le gène de résistance au MLS) et ces colonies devraient avoir un phénotype SCV (petite colonie). Afin de s'assurer de la stabilité de la mutation, piquer quelques colonies sur un pétris sans antibiotique. Piquer les colonies résultantes de nouveaux sur un pétris avec antibiotiques (MLS 1x). Si les colonies repoussent de nouveaux, celles-ci devraient avoir la mutation stable. Outre le phénotype petite colonie, un séquençage du gène *hemB* devra être fait afin de s'assurer que le changement allélique s'est produit à la bonne place.

3.1.2.4 Tests de CMI

Afin d'évaluer leur résistance, les mutants de *B. subtilis* SCV, possédant une des mutations dans le gène *atpE* retrouvées chez *S. aureus*, devront être testés en CMI avec la tomatidine, les deux formes de FC04-100 et la gentamicine (en se servant de *B. subtilis* Δ *hemB* comme souche contrôle sensible, à noter que cette souche est résistante au MLS, gène inséré dans

son gène *hemB* pour briser le gène (Bacillus Genetic Stock Center). Il est attendu que les isolats portant une mutation dans l'*atpE* deviennent résistants à la tomatidine et dérivés.

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

L'obtention de mutants résistants de *S. aureus* SCV par pression sélective en présence de la tomatidine ou de FC04-100 a permis d'identifier la sous-unité c de l'ATP synthétase comme cible moléculaire potentielle de ces composés. Les résultats indiquent des mutations par substitutions de nucléotide, créant un changement d'acide aminé (figure 4 du chapitre 2), menant chacune au même profil de résistance (tableau 1-2 du chapitre 2), soit un haut niveau de résistance à la tomatidine ($>64 \mu\text{g/ml}$) et un niveau de résistance modéré à FC04-100 (2 pour FcM et 8 pour Fcm). Le niveau de résistance plus élevé pour la tomatidine que pour FC04-100 indique une meilleure efficacité du dérivé. D'ailleurs, aucun mutant résistant n'a été obtenu chez *S. aureus* prototype suite à 40 passages consécutifs en présence de FC04-100. De plus, la spécificité des composés pour les *Bacillales* pourrait être expliquée en partie par la présence de séquences conservées dans la sous-unité c chez les espèces cibles (figure 5 du chapitre 2), étant absentes chez les espèces non cibles (figure 5 du chapitre 2). Les modèles de la sous-unité c seule et en assemblage dodécamérique ont permis de visualiser plus précisément la position des résidus impliqués dans la résistance à la tomatidine et dérivés, étant possiblement les sites de liaisons de ceux-ci (figure 6 du chapitre 2).

L'ATP synthétase est une enzyme ubiquitaire utilisant l'énergie électrochimique afin de synthétiser l'ATP (Capaldi and Aggeler 2002). Par contre, l'ATP synthétase possède une grande variabilité biologique et son essentialité diffère à travers les espèces (von Ballmoos, Cook, and Dimroth 2008; von Ballmoos, Wiedenmann, and Dimroth 2009). Peu d'informations pour *S. aureus* sont disponibles, mais certaines études montrent que l'ATP synthétase est essentielle pour sa croissance et sa survie (Balemans et al. 2012; Ko et al. 2006). Pour les autres *Bacillales*, l'ATP synthétase joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du pH chez *L. monocytogenes* (Cotter, Gahan, and Hill 2000) et des délétions dans l'ATP synthétase chez *B. subtilis* affecte sa croissance (Santana et al. 1994). L'ATP synthétase est également essentielle pour les *Mycobacterium*, autant sur milieux fermentable que non fermentable, pour leur croissance et survie, ainsi que pour les cellules en dormance (Tran and Cook 2005; Koul et al. 2008). La sous-unité c de l'ATP synthétase

mycobactérienne est une cible récemment validé pour le composé bédaquiline, étant spécifique pour ces espèces (Andries et al. 2005; Cohen 2013). La sélection de mutants *in vitro* de *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* résistants à la bédaquiline a mené à l'identification de mutation dans l'*atpE*. L'analyse de modèles structurelles en lien avec les résidus impliqués dans la résistance ont permis de proposer des modèles de liaisons de la molécule à l'interface de deux sous-unité c via la liaison avec des résidus et par interaction avec plusieurs résidus entourant le groupement carboxyle conservé. Ainsi la bédaquiline bloquerait le transfert de protons couplés à la synthèse d'ATP par liaison à l'anneau-c, perturbant ainsi l'interface a/c pour le transfert de protons. Plusieurs résidus sont spécifiques aux mycobactéries et la sommation de ces différents résidus compose le réseau de liaison pour la bédaquiline, rendant celle-ci spécifique pour ces espèces (de Jonge et al. 2007; Segala et al. 2012; L. Preiss et al. 2015). Le mode d'action bactéricide proposé, suite aux études biochimiques et transcriptionnelles (Hards et al. 2015), est une action de « découpleur » impliquant la liaison à l'anneau-c menant à un cycle de proton futile non couplé à la synthèse d'ATP. Il est à noter qu'un délai dans l'effet bactéricide de la bédaquiline est observé et que le processus est électroneutre (aucun changement du potentiel membranaire). Ceci suggère qu'un mécanisme inconnu permet à la bactérie de maintenir son potentiel stable, processus ne pouvant être maintenu définitivement. Ainsi il résulterait par l'augmentation de flux de protons, une stimulation de la consommation d'oxygène et une rupture du ΔpH , observées durant le challenge de traitement à la bédaquiline. Le mode d'action moléculaire de la tomatidine et dérivés est encore inconnu, mais l'obtention de mutants *in vitro* avec des mutations dans l'*atpE* suggère fortement un mécanisme similaire où la tomatidine viendrait perturber l'interface a/c menant à un cycle futile de protons. Par contre, il n'y a pas de délai observé dans l'effet bactéricide de la tomatidine (Guay et al., en soumission), suggérant que le processus pourrait mener à une rupture rapide de la FPM chez la bactérie, ce qui mènerait vers un profil de transcription favorable à la production de ROS, ultimement létale. La présence de séquences conservées au travers des *Bacillales*, spécifiquement les résidus impliqués dans la résistance, composeraient le réseau de liaisons nécessaire pour la tomatidine et dérivés.

Les différentes mutations dans la sous-unité c retrouvées chez les *S. aureus* SCV résistants (Ala17Ser, Gly18Cys, Ser26Leu, Phe47Leu) sont possiblement les sites de liaisons de la tomatidine et dérivés menant à l'interaction avec le groupement carboxyle (Glu54) et le cycle futile de protons. Les trois premières mutations se retrouvent sur la HTM1 de la sous-unité c, donc vers l'intérieur de l'anneau-c, et Phe47Leu sur la HTM2, portant le Glu54. Ainsi le changement d'un de ces trois résidus par un autre viendrait perturber le réseau de liaison, pouvant possiblement se faire au niveau de deux sous-unité c. Le Phe47 pourrait quant à lui agir de manière similaire à ce qui a été observé chez *M. phlei* où la molécule doit interagir avec ce résidu entraînant un changement de conformation permettant la liaison de la tomatidine à sa cible (Preiss et al. 2015). Les résultats avec le présent mutant de surexpression obtenu indiquent une association résistance-mutation (tableau 1 du chapitre 3), où *S. aureus* SCV avec l'*atpE* de type sauvage surexprimant l'*atpE* S26L est rendu résistant à la tomatidine et dérivés. La mutagenèse chez *B. subtilis* va nous permettre dans un premier temps de confirmer l'association résistance-mutation chez une autre espèce ciblée par la tomatidine en plus de confirmer que la spécificité pour les *Bacillales* requiert des résidus spécifiques (permettant d'organiser le réseau de liaison pour la tomatidine).

Une autre confirmation de la cible et du possible mode d'action a été obtenue par des tests d'inhibition de l'ATP synthétase sur des vésicules membranaires inversées de *S. aureus* SCV. La technique est basée sur celle employée par l'équipe de Balemans *et al.*. Les vésicules membranaires inversées sont obtenues par lyse membranaire d'une culture par la « French pressure cell press » (lyse mécanique). Ainsi on obtient les protéines contenues dans la membrane, dont la chaîne respiratoire, avec lesquelles on peut travailler sans le reste de la machinerie bactérienne. Ces membranes sont incubées en présence ou non de composés. La synthèse d'ATP par l'ATP synthétase est stimulée par l'ajout de NADH (permettant le transfert de protons via la chaîne respiratoire). La production d'ATP est mesurée indirectement via un système luciférine-luciférase où la luciférase utilise l'ATP et la luciférine afin de produire de la lumière. Les résultats obtenus à la figure 1 sont très intéressants. Dans un premier temps, ils démontrent qu'une souche SCV est apte à produire de l'ATP par phosphorylation oxydative malgré les altérations de la chaîne respiratoire

(contrôle sans composé et avec levofloxacin, composé sans effet sur la chaîne respiratoire). Ainsi, on peut supposer que l'ATP synthétase joue un rôle important pour la croissance et probablement pour la survie de celle-ci. Dans un second temps, les résultats montrent que la tomatidine et le dérivé FcM sont aptes à inhiber la production d'ATP de façon dose dépendante avec un niveau d'inhibition pouvant être comparable à l'inhibiteur non spécifique de l'ATP synthétase DCCD. Cela vient donc renforcer l'hypothèse où la tomatidine et dérivés cible la sous-unité c, perturberait le cycle de protons, affectant la production d'ATP.

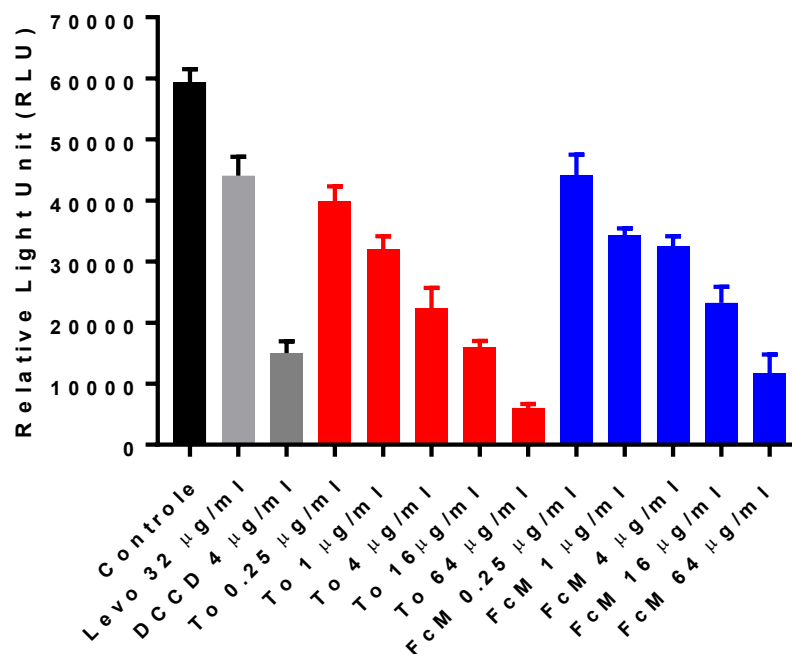


Figure 1. Tests d'inhibition de l'ATP synthétase dans des vésicules membranaires inversées de *S. aureus* Δ hemB. « Relative Light Unit » (RLU) représente la quantité relative de lumière produite par le système luciférase-luciférine, mesurant indirectement la production d'ATP. Le contrôle représente la production d'ATP sans composé.

La tomatidine ne possède pas d'activité bactéricide contre les souches de *Bacillales* prototypes (CMI >64 µg/ml) alors que le dérivé FC04-100 oui. Dans le cas de la bédaquiline, il a été démontré que la FPM n'influençait pas l'activité de celle-ci et qu'elle

était active à pH neutre et acide. Par contre, son affinité diminue avec l'augmentation de force ionique (Anna C. Haagsma et al. 2011). On peut supposer dans un premier temps que le dérivé FC04-100 possède une meilleure affinité que la tomatidine pour les sites de liaisons dans la sous-unité c. Ainsi, alors que la liaison de la tomatidine serait défavorisée par une force ionique plus forte chez la souche prototype, le dérivé FC04-100 serait apte à s'y lier quand même ayant une plus forte affinité. Ensuite, des mutations dans la sous-unité c de l'ATP synthétase ont été retrouvées chez des souches SCV résistantes à la tomatidine et FC04-100, alors qu'aucun développement de résistance n'a été observé pour la souche prototype en présence de FC04-100. Bien que chaque mutation dans la sous-unité c donne le même profil de résistance au SCV, le niveau de résistance est beaucoup plus élevé pour la tomatidine que pour FC04-100. La CMI de FC04-100 pour les SCV résistants est de 2 µg/ml pour FcM et 8 µg/ml pour Fcm, ce qui est comparable aux CMI pour une souche prototype de *S. aureus* (2 à 8 µg/ml pour FcM et 8-16 µg/ml pour Fcm). On peut donc supposer que deux mutations dans la sous-unité c pourraient être nécessaires afin d'obtenir un niveau de résistance plus élevé à FC04-100 (l'empêcherait complètement de se lier) chez le SCV et afin d'obtenir de la résistance chez le prototype. L'une des différences majeures entre une souche SCV et prototype est l'altération de la chaîne respiratoire (influençant donc la FPM, potentiel membranaire, homéostasie du pH, force ionique...). Ainsi, il est possible qu'une souche SCV supporte mieux une mutation dans l'ATP synthétase, ayant déjà une chaîne respiratoire déficiente, alors qu'une mutation (voir deux) pour le prototype pourrait être vraiment défavorable.

Une mutation dans le gène *ccpA*, associée à un faible niveau de résistance, a été retrouvée aussi chez les souches SCV sélectionnés en présence de tomatidine seulement (figure 3 du chapitre 2). Cette mutation est conservée dans les souches avec un haut niveau de résistance (figure 2 du chapitre 2). Ce gène code pour le catabolite carbon protein A, régulateur clé du métabolisme du carbone hautement conservé chez les bactéries Gram positives à bas G + C (Fujita 2009). Le régulateur agit en tant qu'activateur et répresseur de gènes ou d'opérons permettant à la bactérie d'utiliser des sources de carbones préférentielles au lieu de sources secondaires. Par exemple en présence de glucose, le profil de régulation des gènes par CcpA va mener à un métabolisme où le cycle tricarboxylique, la chaîne

respiratoire et le métabolisme secondaire seront plutôt réprimés alors que la glycolyse ainsi que la fermentation seront plutôt activés (Moreno et al. 2001; Seidl et al. 2009). L'effet de la mutation G149V associé au faible niveau de résistance à la tomatidine n'est pas connue. En se basant sur les études structurales réalisées sur CcpA (Schumacher et al. 2007; Schumacher et al. 2011), le résidu G149 se retrouve dans la grande partie C-terminale de la protéine comportant les sites de liaisons aux effecteurs et les domaines d'oligomérisation. Cette mutation pourrait donc affecter la liaison de corégulateurs, affectant ainsi la régulation même de CcpA. En prenant en compte également que la tomatidine affecte les SCV seulement ayant une chaîne respiratoire défectueuse par rapport à la souche prototype, la FPM (ou homéostasie du pH, potentiel membranaire et force ionique) pourrait être affectée directement via la régulation du TCA ou de la chaîne respiratoire, donc affecterait la liaison de la tomatidine pour sa cible. Il a été montré que le cytochrome bd (composante de la chaîne respiratoire ne translocalisant pas les protons au travers de la membrane) est important pour la survie en présence de bédaquiline chez *Mycobacterium* (Berney, Hartman, and Jacobs 2014; Hards et al. 2015). Or, il a été montré chez *B. subtilis* que l'opéron *cidABCD* (cytochrome bd oxydase) est réprimé de façon CcpA-dépendante en présence de glucose (Moreno et al. 2001). Ainsi, la souche SCV ayant la mutation G149V pourrait avoir une meilleure expression du cytochrome bd lui conférant une meilleure survie face à la tomatidine. De plus, il a été démontré chez *S. aureus* que CcpA régule plusieurs facteurs de virulence et est impliqué dans la résistance de certains antibiotiques ou désinfectant (Seidl et al. 2006; Seidl et al. 2009; Lamichhane-Khadka et al. 2008). La tomatidine possède une activité anti-virulente chez les souches prototypes (Mitchell et al. 2012) qui pourrait être reliée à sa régulation de facteurs de virulence. Dans le cas de FC04-100, aucune mutation n'est retrouvée dans *ccpA*, ce qui est consistant avec le fait qu'un seul niveau de résistance a été obtenu. Compte tenu que l'effet de la mutation dans *ccpA* pourrait vraisemblablement affecter l'affinité de la tomatidine pour sa cible (en affectant le métabolisme donc la FPM, homéostasie du pH, etc) et que FC04-100 possède vraisemblablement une meilleure affinité (étant inhibiteur pour les prototypes), il n'est pas surprenant qu'aucune mutation dans ce gène n'ait été retrouvée.

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, cette étude a permis d'identifier la sous-unité c de l'ATP synthétase comme cible moléculaire potentielle de la tomatidine et dérivés. La spécificité contre les *Bacillales* semble être expliquée par la présence de séquences conservées dans leur sous-unité c de l'ATP synthétase créant le réseau de coordination nécessaire à la liaison de la tomatidine. Les dérivés de la tomatidine semblent être de bons candidats puisque le niveau de résistance retrouvé chez les SCV résistants est beaucoup plus faible que celui de la tomatidine. FC04-100 est également inhibiteur contre les souches prototypes, ayant à priori une meilleure affinité, et semble prévenir l'apparition de résistances chez celles-ci pour le moment. Malgré tout, la cible doit être encore confirmée de façon définitive ainsi que le mode d'action moléculaire qui doit être exploré plus en profondeur.

Dans un premier temps, il faudra terminer la délétion du gène *hemB* chez les mutants *B. subtilis* ayant subi le changement allélique du gène *atpE* (possèdent l'une des quatre mutations retrouvées chez les mutants *S. aureus* SCV). Ainsi des tests de CMI pourront être effectués sur eux afin de déterminer si ces résidus sont également impliqués dans la résistance chez *B. subtilis*. Cela viendrait d'une part confirmer la cible et d'autre part confirmer la spécificité envers les *Bacillales* par la présence de séquences conservées. Il faudra continuer l'obtention des recombinants de surexpression du gène *atpE* chez *S. aureus* SCV afin de confirmer l'association mutation-résistance, venant également en partie confirmer la cible. Ultimement, un changement allélique du gène *atpE* chez *S. aureus* SCV serait à envisager afin de confirmer de façon définitive l'implication de ces résidus dans la résistance à la tomatidine et dérivés. Les tests de résonance des plasmons de surface pourraient être une technique rapide afin de confirmer la liaison des composés à la sous-unité c purifiée de *S. aureus* SCV. L'obtention de mutants résistants supplémentaires pourraient mener à l'identification de nouveaux résidus impliqués dans la résistance ou de confirmer les mutations déjà retrouvées. Ces informations vont aider à la modélisation de la sous-unité c avec ou sans la tomatidine (ou dérivés) en prenant en compte l'importance des résidus critiques dans la résistance. Je suggère que les modèles soient faits en prenant au moins deux sous-unité c puisque le réseau de liaisons pourrait en impliquer deux. Les

tests d'inhibition de l'ATP synthétase pourront donner une première idée du mode d'action (inhibition de la synthèse d'ATP entre autres), l'importance de la liaison à la cible (membranes de mutants résistants) et la spécificité (mitochondrie et *E. coli*). Les paramètres électrochimiques (potentiel membranaire, gradient de pH et force proton motrice), la consommation d'oxygène et la production de ROS devraient être mesurés durant les challenges de traitement à la tomatidine, afin de vérifier si par exemple il y a effondrement de l'un ces paramètres qui pourraient causer la mort de la bactérie. En parallèle, le profil transcriptomique pourrait révéler des informations pertinentes sur la réponse de la bactérie face à l'antibiotique. Notamment, plusieurs gènes de la chaîne respiratoire, du cycle tricarboxylique, de la glycolyse, de la production de ROS et certains régulateurs comme *ccpA* seraient intéressent à vérifier. Donc au fond, vérifier comment la bactérie répond au blocage de transfert d'électrons (par liaison de la tomatidine à la sous-unité c) qui vraisemblablement causerait sa mort.

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahams, Jan Pieter, Andrew G. W. Leslie, René Lutter, and John E. Walker. 1994. "Structure at 2.8 Å Resolution of F1-ATPase from Bovine Heart Mitochondria." *Nature* 370 (6491): 621–28. doi:10.1038/370621a0.
- Abranches, Jacqueline, Marcelle M Nascimento, Lin Zeng, Christopher M Browngardt, Zezhang T Wen, Mercedes F Rivera, and Robert A Burne. 2008. "CcpA Regulates Central Metabolism and Virulence Gene Expression in Streptococcus Mutans." *Journal of Bacteriology* 190 (7). American Society for Microbiology: 2340–49. doi:10.1128/JB.01237-07.
- Ahn, S.-J., K. C. Rice, J. Oleas, K. W. Bayles, and R. A. Burne. 2010. "The Streptococcus Mutans Cid and Lrg Systems Modulate Virulence Traits in Response to Multiple Environmental Signals." *Microbiology* 156 (10): 3136–47. doi:10.1099/mic.0.039586-0.
- Alavian, Kambiz N, Gisela Beutner, Emma Lazrove, Silvio Sacchetti, Han-A Park, Pawel Licznerski, Hongmei Li, et al. 2014. "An Uncoupling Channel within the c-Subunit Ring of the F1FO ATP Synthase Is the Mitochondrial Permeability Transition Pore." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (29). National Academy of Sciences: 10580–85. doi:10.1073/pnas.1401591111.
- Almeida, Deepak, Thomas Ioerger, Sandeep Tyagi, Si-Yang Li, Khisimuzi Mdluli, Koen Andries, Jacques Grosset, Jim Sacchettini, and Eric Nuermberger. 2016. "Mutations in pepQ Confer Low-Level Resistance to Bedaquiline and Clofazimine in Mycobacterium Tuberculosis." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (8): 4590–99. doi:10.1128/AAC.00753-16.
- Andries, Koen, Peter Verhasselt, Jerome Guillemont, Hinrich W H Göhlmann, Jean-Marc Neefs, Hans Winkler, Jef Van Gestel, et al. 2005. "A Diarylquinoline Drug Active

on the ATP Synthase of Mycobacterium Tuberculosis.” *Science (New York, N.Y.)* 307 (5707): 223–27. doi:10.1126/science.1106753.

Andries, Koen, Cristina Villellas, Nele Coeck, Kim Thys, Tom Gevers, Luc Vranckx, Nacer Lounis, Bouke C de Jong, and Anil Koul. 2014. “Acquired Resistance of Mycobacterium Tuberculosis to Bedaquiline.” *PloS One* 9 (7): e102135. doi:10.1371/journal.pone.0102135.

Archer, G L. 1998. “Staphylococcus Aureus: A Well-Armed Pathogen.” *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 26 (5): 1179–81.

Arnaud, Maryvonne, Arnaud Chastanet, and Michel Débarbouillé. 2004. “New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria.” *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11). American Society for Microbiology (ASM): 6887–91. doi:10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004.

Assefa, S., T. M. Keane, T. D. Otto, C. Newbold, and M. Berriman. 2009. “ABACAS: Algorithm-Based Automatic Contiguation of Assembled Sequences.” *Bioinformatics* 25 (15): 1968–69. doi:10.1093/bioinformatics/btp347.

Atalla, Heba, Carlton Gyles, Christian L Jacob, Helene Moisan, François Malouin, and Bonnie Mallard. 2008. “Characterization of a Staphylococcus Aureus Small Colony Variant (SCV) Associated with Persistent Bovine Mastitis.” *Foodborne Pathogens and Disease* 5 (6): 785–99. doi:10.1089/fpd.2008.0110.

Balemans, Wendy, Luc Vranckx, Nacer Lounis, Ovidiu Pop, Jérôme Guillemont, Karen Vergauwen, Selenia Mol, et al. 2012. “Novel Antibiotics Targeting Respiratory ATP Synthesis in Gram-Positive Pathogenic Bacteria.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (8): 4131–39. doi:10.1128/AAC.00273-12.

- Behari, J, and P Youngman. 1998. "A Homolog of CcpA Mediates Catabolite Control in *Listeria Monocytogenes* but Not Carbon Source Regulation of Virulence Genes." *Journal of Bacteriology* 180 (23): 6316–24.
- Beierlein, J M, and A C Anderson. 2011. "New Developments in Vaccines, Inhibitors of Anthrax Toxins, and Antibiotic Therapeutics for *Bacillus Anthracis*." *Current Medicinal Chemistry* 18 (33): 5083–94.
- Berney, Michael, Travis E Hartman, and William R Jacobs. 2014. "A *Mycobacterium Tuberculosis* Cytochrome Bd Oxidase Mutant Is Hypersensitive to Bedaquiline." *mBio* 5 (4): e01275-14. doi:10.1128/mBio.01275-14.
- Bottone, Edward J. 2010. "Bacillus Cereus, a Volatile Human Pathogen." *Clinical Microbiology Reviews* 23 (2): 382–98. doi:10.1128/CMR.00073-09.
- Boucher, Helen W, George H Talbot, John S Bradley, John E Edwards, David Gilbert, Louis B Rice, Michael Scheld, Brad Spellberg, and John Bartlett. 2009. "Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America." *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 48 (1): 1–12. doi:10.1086/595011.
- Boulanger, Simon, Gabriel Mitchell, Kamal Bouarab, Ûric Marsault, André Cantin, Eric H Frost, Eric Déziel, and François Malouin. 2015. "Bactericidal Effect of Tomatidine-Tobramycin Combination against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and *Pseudomonas Aeruginosa* Is Enhanced by Interspecific Small-Molecule Interactions." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59 (12): 7458–64. doi:10.1128/AAC.01711-15.
- Boyer, Paul D. 1997. "THE ATP SYNTHASE—A SPLENDID MOLECULAR MACHINE." *Annual Review of Biochemistry* 66 (1). Annual Reviews 4139 El

Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA : 717–49.
doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717.

Brouillette, Eric, Alejandro Martinez, Bobbi J Boyll, Norris E Allen, and François Malouin. 2004. “Persistence of a Staphylococcus Aureus Small-Colony Variant under Antibiotic Pressure in Vivo.” *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 41 (1): 35–41. doi:10.1016/j.femsim.2003.12.007.

Cabezón, E, M J Runswick, A G Leslie, J E Walker, JP. Abrahams, AGW. Leslie, AT. Brunger, et al. 2001. “The Structure of Bovine IF(1), the Regulatory Subunit of Mitochondrial F-ATPase.” *The EMBO Journal* 20 (24). EMBO Press: 6990–96. doi:10.1093/emboj/20.24.6990.

Capaldi, Roderick A, and Robert Aggeler. 2002. “Mechanism of the F(1)F(0)-Type ATP Synthase, a Biological Rotary Motor.” *Trends in Biochemical Sciences* 27 (3): 154–60.

Casey, A L, P A Lambert, and T S J Elliott. 2007. “Staphylococci.” *International Journal of Antimicrobial Agents* 29 Suppl 3 (May): S23-32. doi:10.1016/S0924-8579(07)72175-1.

Chagnon, Félix, Isabelle Guay, Marc-André Bonin, Gabriel Mitchell, Kamal Bouarab, François Malouin, and Éric Marsault. 2014. “Unraveling the Structure-Activity Relationship of Tomatidine, a Steroid Alkaloid with Unique Antibiotic Properties against Persistent Forms of Staphylococcus Aureus.” *European Journal of Medicinal Chemistry* 80 (June): 605–20. doi:10.1016/j.ejmech.2013.11.019.

Chai, Yunrong, Frances Chu, Roberto Kolter, and Richard Losick. 2007. “Bistability and Biofilm Formation in Bacillus Subtilis.” *Molecular Microbiology* 67 (2): 254–63. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06040.x.

- Charpentier, Emmanuelle, Ana I Anton, Peter Barry, Berenice Alfonso, Yuan Fang, and Richard P Novick. 2004. "Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10): 6076–85. doi:10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004.
- Checinska, Aleksandra, Andrzej Paszczynski, and Malcolm Burbank. 2015. "Bacillus and Other Spore-Forming Genera: Variations in Responses and Mechanisms for Survival." *Annual Review of Food Science and Technology* 6 (January). Annual Reviews: 351–69. doi:10.1146/annurev-food-030713-092332.
- Chiang, C., C. Bongiorno, and M. Perego. 2011. "Glucose-Dependent Activation of Bacillus Anthracis Toxin Gene Expression and Virulence Requires the Carbon Catabolite Protein CcpA." *Journal of Bacteriology* 193 (1): 52–62. doi:10.1128/JB.01656-09.
- Chiu, Feng-Lan, and Jen-Kun Lin. 2008. "Tomatidine Inhibits iNOS and COX-2 through Suppression of NF-kappaB and JNK Pathways in LPS-Stimulated Mouse Macrophages." *FEBS Letters* 582 (16): 2407–12. doi:10.1016/j.febslet.2008.05.049.
- Choi, Suk Hyun, Jun-Bae Ahn, Nobuyuki Kozukue, Hyun-Jeong Kim, Yosuke Nishitani, Ling Zhang, Masashi Mizuno, Carol E Levin, and Mendel Friedman. 2012. "Structure-Activity Relationships of α -, β (1)-, γ -, and δ -Tomatine and Tomatidine against Human Breast (MDA-MB-231), Gastric (KATO-III), and Prostate (PC3) Cancer Cells." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (15). American Chemical Society: 3891–99. doi:10.1021/jf3003027.
- Clsi. 2013. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute*. Vol. 32.
- Coates, Anthony, Yanmin Hu, Richard Bax, and Clive Page. 2002. "The Future

Challenges Facing the Development of New Antimicrobial Drugs.” *Nature Reviews. Drug Discovery* 1 (11): 895–910. doi:10.1038/nrd940.

Coates, Anthony R M, Gerry Halls, and Yanmin Hu. 2011. “Novel Classes of Antibiotics or More of the Same?” *British Journal of Pharmacology* 163 (1): 184–94. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x.

Cohen, Jon. 2013. “Infectious Disease. Approval of Novel TB Drug Celebrated--with Restraint.” *Science (New York, N.Y.)* 339 (6116): 130. doi:10.1126/science.339.6116.130.

Cotter, Paul D., Cormac G.M. Gahan, and Colin Hill. 2000. “Analysis of the Role of the *Listeria Monocytogenes* F0F1-ATPase Operon in the Acid Tolerance Response.” *International Journal of Food Microbiology* 60 (2–3): 137–46. doi:10.1016/S0168-1605(00)00305-6.

Crago, B, C Ferrato, S J Drews, L W Svenson, G Tyrrell, and M Louie. 2012. “Prevalence of *Staphylococcus Aureus* and Methicillin-Resistant *S. Aureus* (MRSA) in Food Samples Associated with Foodborne Illness in Alberta, Canada from 2007 to 2010.” *Food Microbiology* 32 (1): 202–5. doi:10.1016/j.fm.2012.04.012.

Crooke, Adrienne K, James R Fuller, Markus W Obrist, Sarah E Tomkovich, Nicholas P Vitko, and Anthony R Richardson. 2013. “CcpA-Independent Glucose Regulation of Lactate Dehydrogenase 1 in *Staphylococcus Aureus*.” *PloS One* 8 (1): e54293. doi:10.1371/journal.pone.0054293.

Cui, Longzhu, Hui-min Neoh, Akira Iwamoto, and Keiichi Hiramatsu. 2012. “Coordinated Phenotype Switching with Large-Scale Chromosome Flip-Flop Inversion Observed in Bacteria.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (25): E1647-56. doi:10.1073/pnas.1204307109.

- Curtis, Thomas D, Lone Gram, and Gitte M Knudsen. 2016. “The Small Colony Variant of *Listeria Monocytogenes* Is More Tolerant to Antibiotics and Has Altered Survival in RAW 264.7 Murine Macrophages.” *Frontiers in Microbiology* 7. Frontiers Media SA: 1056. doi:10.3389/fmicb.2016.01056.
- Dasenbrook, Elliott C, Christian A Merlo, Marie Diener-West, Noah Lechtzin, and Michael P Boyle. 2008. “Persistent Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and Rate of FEV1 Decline in Cystic Fibrosis.” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 178 (8): 814–21. doi:10.1164/rccm.200802-327OC.
- de Jonge, Marc R, Luc H M Koymans, Jérôme E G Guillemont, Anil Koul, and Koen Andries. 2007. “A Computational Model of the Inhibition of *Mycobacterium Tuberculosis* ATPase by a New Drug Candidate R207910.” *Proteins* 67 (4): 971–80. doi:10.1002/prot.21376.
- Deutscher, J, M H Saier, and Jr. 1983. “ATP-Dependent Protein Kinase-Catalyzed Phosphorylation of a Seryl Residue in HPr, a Phosphate Carrier Protein of the Phosphotransferase System in *Streptococcus Pyogenes*.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (22). National Academy of Sciences: 6790–94.
- Deutscher, Josef. 2008. “The Mechanisms of Carbon Catabolite Repression in Bacteria.” *Current Opinion in Microbiology* 11 (2): 87–93. doi:10.1016/j.mib.2008.02.007.
- Deutscher, Josef, Christof Francke, and Pieter W Postma. 2006. “How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 70 (4). American Society for Microbiology (ASM): 939–1031. doi:10.1128/MMBR.00024-06.
- Diez, Manuel, Boris Zimmermann, Michael Börsch, Marcelle König, Enno

- Schweinberger, Stefan Steigmiller, Rolf Reuter, et al. 2004. "Proton-Powered Subunit Rotation in Single Membrane-Bound F₀F₁-ATP Synthase." *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (2). Nature Publishing Group: 135–41. doi:10.1038/nsmb718.
- Dimroth, Peter. 1997. "Primary Sodium Ion Translocating Enzymes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1318 (1): 11–51. doi:10.1016/S0005-2728(96)00127-2.
- Donlan, Rodney M, and J William Costerton. 2002. "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms." *Clinical Microbiology Reviews* 15 (2): 167–93.
- Drobinskaya, I.Ye., I.A. Kozlov, M.B. Murataliev, and E.N. Vulfson. 1985. "Tightly Bound Adenosine Diphosphate, Which Inhibits the Activity of Mitochondrial F₁ - ATPase, Is Located at the Catalytic Site of the Enzyme." *FEBS Letters* 182 (2): 419–24. doi:10.1016/0014-5793(85)80346-X.
- Dupuy, B, and A L Sonenshein. 1998. "Regulated Transcription of Clostridium Difficile Toxin Genes." *Molecular Microbiology* 27 (1): 107–20.
- Feniouk, Boris A, Yasuyuki Kato-Yamada, Masasuke Yoshida, Toshiharu Suzuki, C. von Ballmoos, G.M. Cook, P. Dimroth, et al. 2010. "Conformational Transitions of Subunit Epsilon in ATP Synthase from Thermophilic Bacillus PS3." *Biophysical Journal* 98 (3). Elsevier: 434–42. doi:10.1016/j.bpj.2009.10.023.
- Ferreira, V, M Wiedmann, P Teixeira, and M J Stasiewicz. 2014. "Listeria Monocytogenes Persistence in Food-Associated Environments: Epidemiology, Strain Characteristics, and Implications for Public Health." *Journal of Food Protection* 77 (1): 150–70. doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-150.

- Ferri, Maurizio, Elena Ranucci, Paola Romagnoli, and Valerio Giaccone. 2015. "Antimicrobial Resistance: A Global Emerging Threat to Public Health Systems." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, October. doi:10.1080/10408398.2015.1077192.
- Fillingame, Robert H., and P. Ryan Steed. 2014. "Half Channels Mediating H⁺ Transport and the Mechanism of Gating in the Fo Sector of Escherichia Coli F1Fo ATP Synthase." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. doi:10.1016/j.bbabo.2014.03.005.
- Fillingame, Robert H, Christine M Angevine, and Oleg Y Dmitriev. 2003. "Mechanics of Coupling Proton Movements to *c* -Ring Rotation in ATP Synthase." *FEBS Letters* 555 (1): 29–34. doi:10.1016/S0014-5793(03)01101-3.
- Formentini, Laura, María Sánchez-Aragó, Laura Sánchez-Cenizo, and José M. Cuezva. 2012. "The Mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 Triggers a ROS-Mediated Retrograde Prosurvival and Proliferative Response." *Molecular Cell* 45 (6): 731–42. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.008.
- Frenzel, Elrike, Markus Kranzler, Timo D Stark, Thomas Hofmann, and Monika Ehling-Schulz. 2015. "The Endospore-Forming Pathogen *Bacillus Cereus* Exploits a Small Colony Variant-Based Diversification Strategy in Response to Aminoglycoside Exposure." *mBio* 6 (6). doi:10.1128/mBio.01172-15.
- Friedman, Mendel, Carol E Levin, Seung-Un Lee, Hyun-Jeong Kim, In-Seon Lee, Jae-Oke Byun, and Nobuyuki Kozukue. 2009. "Tomatine-Containing Green Tomato Extracts Inhibit Growth of Human Breast, Colon, Liver, and Stomach Cancer Cells." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (13). American Chemical Society: 5727–33. doi:10.1021/jf900364j.
- Fujita, Yasutaro. 2009. "Carbon Catabolite Control of the Metabolic Network in *Bacillus*

Subtilis.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73 (2): 245–59.
doi:10.1271/bbb.80479.

Fujiwara, Yukio, Naoko Kiyota, Keiichiro Tsurushima, Makiko Yoshitomi, Hasita Horlad, Tsuyoshi Ikeda, Toshihiro Nohara, Motohiro Takeya, and Ryoji Nagai. 2012. “Tomatidine, a Tomato Sapogenol, Ameliorates Hyperlipidemia and Atherosclerosis in apoE-Deficient Mice by Inhibiting Acyl-CoA:cholesterol Acyl-Transferase (ACAT).” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (10): 2472–79. doi:10.1021/jf204197r.

García-Álvarez, Laura, Matthew T G Holden, Heather Lindsay, Cerian R Webb, Derek F J Brown, Martin D Curran, Enid Walpole, et al. 2011. “Meticillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* with a Novel *mecA* Homologue in Human and Bovine Populations in the UK and Denmark: A Descriptive Study.” *The Lancet. Infectious Diseases* 11 (8): 595–603. doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8.

Garzoni, Christian, and William L Kelley. 2009. “*Staphylococcus Aureus*: New Evidence for Intracellular Persistence.” *Trends in Microbiology* 17 (2): 59–65.
doi:10.1016/j.tim.2008.11.005.

Giammarinaro, Philippe, and James C Paton. 2002. “Role of RegM, a Homologue of the Catabolite Repressor Protein CcpA, in the Virulence of *Streptococcus Pneumoniae*.” *Infection and Immunity* 70 (10): 5454–61.

Girvin, Mark E., and Vinit K. Rastogi. 1999. “Structural Changes Linked to Proton Translocation by Subunit c of the ATP Synthase.” *Nature* 402 (6759). Nature Publishing Group: 263–68. doi:10.1038/46224.

Goerke, Christiane, and Christiane Wolz. 2004. “Regulatory and Genomic Plasticity of *Staphylococcus Aureus* during Persistent Colonization and Infection.” *International Journal of Medical Microbiology : IJMM* 294 (2–3): 195–202.

doi:10.1016/j.ijmm.2004.06.013.

Gómez-González, Carmen, Joshi Acosta, Jennifer Villa, Laura Barrado, Francisca Sanz, M Angeles Orellana, Joaquín R Otero, and Fernando Chaves. 2010. "Clinical and Molecular Characteristics of Infections with CO₂-Dependent Small-Colony Variants of *Staphylococcus Aureus*." *Journal of Clinical Microbiology* 48 (8): 2878–84. doi:10.1128/JCM.00520-10.

González-Lamothe, Rocío, Gabriel Mitchell, Mariza Gattuso, Moussa S Diarra, François Malouin, and Kamal Bouarab. 2009. "Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens." *International Journal of Molecular Sciences* 10 (8): 3400–3419. doi:10.3390/ijms10083400.

Gordon, Rachel J., and Franklin D. Lowy. 2008. "Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infection." *Clinical Infectious Diseases* 46 (S5): S350–59. doi:10.1086/533591.

Guay, Isabelle. n.d. "Tomatidine and Analog FC04-100 Possess Bactericidal Activities against the Small Colony Variants of Some Firmicutes Including Those of *Listeria Monocytogenes* and Are Bactericidal in Combination with Aminoglycosides against Their Normal Phenotype." *BMC Complementary and Alternative Medicine*.

Guex, N, and M C Peitsch. 1997. "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling." *Electrophoresis* 18 (15): 2714–23. doi:10.1002/elps.1150181505.

Haagsma, A. C., R. Abdillahi-Ibrahim, M. J. Wagner, K. Krab, K. Vergauwen, J. Guillemont, K. Andries, H. Lill, A. Koul, and D. Bald. 2009. "Selectivity of TMC207 towards Mycobacterial ATP Synthase Compared with That towards the Eukaryotic Homologue." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (3): 1290–92. doi:10.1128/AAC.01393-08.

- Haagsma, Anna C., Ioana Podasca, Anil Koul, Koen Andries, Jerome Guillemont, Holger Lill, and Dirk Bald. 2011. "Probing the Interaction of the Diarylquinoline TMC207 with Its Target Mycobacterial ATP Synthase." *PLoS ONE* 6 (8): 1–7. doi:10.1371/journal.pone.0023575.
- Hards, K., J. R. Robson, M. Berney, L. Shaw, D. Bald, A. Koul, K. Andries, and G. M. Cook. 2015. "Bactericidal Mode of Action of Bedaquiline." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, March. doi:10.1093/jac/dkv054.
- Henkin, Tina M. 1996. "The Role of the CcpA Transcriptional Regulator in Carbon Metabolism in *Bacillus Subtilis*." *FEMS Microbiology Letters* 135 (1). The Oxford University Press: 9–15. doi:10.1111/j.1574-6968.1996.tb07959.x.
- Hirono-Hara, Y, H Noji, M Nishiura, E Muneyuki, K Y Hara, R Yasuda, K Kinoshita, and M Yoshida. 2001. "Pause and Rotation of F(1)-ATPase during Catalysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (24). National Academy of Sciences: 13649–54. doi:10.1073/pnas.241365698.
- Hoch, J A. 1993. "Regulation of the Phosphorelay and the Initiation of Sporulation in *Bacillus Subtilis*." *Annual Review of Microbiology* 47 (January): 441–65. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.002301.
- Høiby, Niels, Thomas Bjarnsholt, Michael Givskov, Søren Molin, and Oana Ciofu. 2010. "Antibiotic Resistance of Bacterial Biofilms." *International Journal of Antimicrobial Agents* 35 (4): 322–32. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- Hong, Sangjin, and Peter L Pedersen. 2008. "ATP Synthase and the Actions of Inhibitors Utilized to Study Its Roles in Human Health, Disease, and Other Scientific Areas." *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 72 (4). American Society for Microbiology (ASM): 590–641, Table of Contents. doi:10.1128/MMBR.00016-08.

- Huang, Huarong, Shaohua Chen, Jeremiah Van Doren, Dongli Li, Chelsea Farichon, Yan He, Qiuyan Zhang, et al. 2015. “ α -Tomatine Inhibits Growth and Induces Apoptosis in HL-60 Human Myeloid Leukemia Cells.” *Molecular Medicine Reports* 11 (6): 4573–78. doi:10.3892/mmr.2015.3238.
- Hurdle, Julian G., Alex J. O’Neill, Ian Chopra, and Richard E. Lee. 2011. “Targeting Bacterial Membrane Function: An Underexploited Mechanism for Treating Persistent Infections.” *Nature Reviews Microbiology* 9 (1): 62–75. doi:10.1038/nrmicro2474.
- Hyndman, D J, Y M Milgrom, E A Bramhall, and R L Cross. 1994. “Nucleotide-Binding Sites on Escherichia Coli F1-ATPase. Specificity of Noncatalytic Sites and Inhibition at Catalytic Sites by MgADP.” *The Journal of Biological Chemistry* 269 (46): 28871–77.
- Iyer, R., N. S. Baliga, and A. Camilli. 2005. “Catabolite Control Protein A (CcpA) Contributes to Virulence and Regulation of Sugar Metabolism in Streptococcus Pneumoniae.” *Journal of Bacteriology* 187 (24): 8340–49. doi:10.1128/JB.187.24.8340-8349.2005.
- Jankovic, I, O Egeter, and R Brückner. 2001. “Analysis of Catabolite Control Protein A-Dependent Repression in Staphylococcus Xylosus by a Genomic Reporter Gene System.” *Journal of Bacteriology* 183 (2): 580–86. doi:10.1128/JB.183.2.580-586.2001.
- Jiang, W., J. Hermolin, and R. H. Fillingame. 2001. “The Preferred Stoichiometry of c Subunits in the Rotary Motor Sector of Escherichia Coli ATP Synthase Is 10.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (9): 4966–71. doi:10.1073/pnas.081424898.

- Kahl, Barbara C. 2014. “Small Colony Variants (SCVs) of *Staphylococcus Aureus*--a Bacterial Survival Strategy.” *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 21 (January): 515–22. doi:10.1016/j.meegid.2013.05.016.
- Kahl, Barbara C, Angelika Duebbers, Gabriele Lubritz, Johannes Haeberle, Hans G Koch, Barbara Ritzerfeld, Marion Reilly, et al. 2003. “Population Dynamics of Persistent *Staphylococcus Aureus* Isolated from the Airways of Cystic Fibrosis Patients during a 6-Year Prospective Study.” *Journal of Clinical Microbiology* 41 (9): 4424–27.
- Kato-Yamada, Yasuyuki. 2005. “Isolated ϵ Subunit of *Bacillus Subtilis* F₁-ATPase Binds ATP.” *FEBS Letters* 579 (30): 6875–78. doi:10.1016/j.febslet.2005.11.036.
- Kim, Hyun-Jin, Agnes Roux, and Abraham L. Sonenshein. 2002. “Direct and Indirect Roles of CcpA in Regulation of *Bacillus Subtilis* Krebs Cycle Genes.” *Molecular Microbiology* 45 (1): 179–90. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03003.x.
- Kim, Jeong-Ho, Young-Ki Yang, and Glenn H Chambliss. 2005. “Evidence That *Bacillus* Catabolite Control Protein CcpA Interacts with RNA Polymerase to Inhibit Transcription.” *Molecular Microbiology* 56 (1): 155–62. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04496.x.
- Ko, K.S., J.Y. Lee, J.H. Song, J.Y. Baek, W.S. Oh, J.S. Chun, and H.S. Yoon. 2006. “Screening of Essential Genes in *Staphylococcus Aureus* N315 Using Comparative Genomics and Allelic Replacement Mutagenesis.” *Journal of Microbiology and Biotechnology*.
- Konkol, M. A., K. M. Blair, and D. B. Kearns. 2013. “Plasmid-Encoded ComI Inhibits Competence in the Ancestral 3610 Strain of *Bacillus Subtilis*.” *Journal of Bacteriology* 195 (18): 4085–93. doi:10.1128/JB.00696-13.

- Koul, Anil, Najoua Dendouga, Karen Vergauwen, Brenda Molenberghs, Luc Vranckx, Rudy Willebrords, Zorica Ristic, et al. 2007. "Diarylquinolines Target Subunit c of Mycobacterial ATP Synthase." *Nature Chemical Biology* 3 (6). Nature Publishing Group: 323–24. doi:10.1038/nchembio884.
- Koul, Anil, Luc Vranckx, Najoua Dendouga, Wendy Balemans, Ilse Van den Wyngaert, Karen Vergauwen, Hinrich W H Göhlmann, et al. 2008. "Diarylquinolines Are Bactericidal for Dormant Mycobacteria as a Result of Disturbed ATP Homeostasis." *The Journal of Biological Chemistry* 283 (37): 25273–80. doi:10.1074/jbc.M803899200.
- Koul, Anil, Luc Vranckx, Neeraj Dhar, Hinrich W.H. Göhlmann, Emre Özdemir, Jean-Marc Neefs, Melanie Schulz, et al. 2014. "Delayed Bactericidal Response of Mycobacterium Tuberculosis to Bedaquiline Involves Remodelling of Bacterial Metabolism." *Nature Communications* 5 (February). Nature Publishing Group: 14–16. doi:10.1038/ncomms4369.
- Krah, Alexander. 2015. "Linking Structural Features from Mitochondrial and Bacterial F-Type ATP Synthases to Their Distinct Mechanisms of ATPase Inhibition." *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 119 (1): 94–102. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2015.06.005.
- Krah, Alexander, Denys Pogoryelov, Julian D Langer, Peter J Bond, Thomas Meier, and José D Faraldo-Gómez. 2010. "Structural and Energetic Basis for H⁺ versus Na⁺ Binding Selectivity in ATP Synthase Fo Rotors." *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 (6–7): 763–72. doi:10.1016/j.bbabbio.2010.04.014.
- Kriegeskorte, André, Stephanie Grubmüller, Claudia Huber, Barbara C Kahl, Christof von Eiff, Richard A Proctor, Georg Peters, Wolfgang Eisenreich, and Karsten Becker. 2014. "Staphylococcus Aureus Small Colony Variants Show Common

Metabolic Features in Central Metabolism Irrespective of the Underlying Auxotrophism.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4 (January): 141. doi:10.3389/fcimb.2014.00141.

Kriegeskorte, André, Simone König, Gunnar Sander, Alexander Pirkel, Esther Mahabir, Richard A Proctor, Christof von Eiff, Georg Peters, and Karsten Becker. 2011. “Small Colony Variants of Staphylococcus Aureus Reveal Distinct Protein Profiles.” *Proteomics* 11 (12): 2476–90. doi:10.1002/pmic.201000796.

Lamichhane-Khadka, R, J T Riordan, A Delgado, A Muthaiyan, T D Reynolds, B J Wilkinson, and J E Gustafson. 2008. “Genetic Changes That Correlate with the Pine-Oil Disinfectant-Reduced Susceptibility Mechanism of Staphylococcus Aureus.” *Journal of Applied Microbiology* 105 (6): 1973–81. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03956.x.

Leiba, Jade, Torsten Hartmann, Marie-Eve Cluzel, Martin Cohen-Gonsaud, Frédéric Delolme, Markus Bischoff, and Virginie Molle. 2012. “A Novel Mode of Regulation of the Staphylococcus Aureus Catabolite Control Protein A (CcpA) Mediated by Stk1 Protein Phosphorylation.” *The Journal of Biological Chemistry* 287 (52): 43607–19. doi:10.1074/jbc.M112.418913.

Leonard, F C, and B K Markey. 2008. “Meticillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Animals: A Review.” *Veterinary Journal (London, England : 1997)* 175 (1): 27–36. doi:10.1016/j.tvjl.2006.11.008.

Lewis, Kim. 2007. “Persister Cells, Dormancy and Infectious Disease.” *Nature Reviews. Microbiology* 5 (1): 48–56. doi:10.1038/nrmicro1557.

Li, Chunling, Fei Sun, Hoonsik Cho, Vamshi Yelavarthi, Changmo Sohn, Chuan He, Olaf Schneewind, and Taeok Bae. 2010. “CcpA Mediates Proline Auxotrophy and Is Required for Staphylococcus Aureus Pathogenesis.” *Journal of Bacteriology* 192

(15): 3883–92. doi:10.1128/JB.00237-10.

Löfblom, J., N. Kronqvist, M. Uhlén, S. Ståhl, and H. Wernérus. 2007. “Optimization of Electroporation-Mediated Transformation: *Staphylococcus Carnosus* as Model Organism.” *Journal of Applied Microbiology* 102 (3). Blackwell Publishing Ltd: 736–47. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03127.x.

Lopez, J M, and B Thoms. 1977. “Role of Sugar Uptake and Metabolic Intermediates on Catabolite Repression in *Bacillus Subtilis*.” *Journal of Bacteriology* 129 (1): 217–24.

Lu, Ping, Holger Lill, and Dirk Bald. 2014. “ATP Synthase in Mycobacteria: Special Features and Implications for a Function as Drug Target.” *Biochimica et Biophysica Acta*, March. doi:10.1016/j.bbabo.2014.01.022.

Martin, James, Jennifer Hudson, Tassilo Hornung, and Wayne D Frasch. 2015. “Fo-Driven Rotation in the ATP Synthase Direction against the Force of F1 ATPase in the FoF1 ATP Synthase.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (17): 10717–28. doi:10.1074/jbc.M115.646430.

Medina, J M, J C F Rodrigues, W De Souza, G C Atella, and H Barrabin. 2012. “Tomatidine Promotes the Inhibition of 24-Alkylated Sterol Biosynthesis and Mitochondrial Dysfunction in *Leishmania Amazonensis* Promastigotes.” *Parasitology* 139 (10): 1253–65. doi:10.1017/S0031182012000522.

Medina, Jorge Mansur, Juliany Cola Fernandes Rodrigues, Otacilio C Moreira, Geórgia Atella, Wanderley de Souza, and Hector Barrabin. 2015. “Mechanisms of Growth Inhibition of *Phytomonas Serpens* by the Alkaloids Tomatine and Tomatidine.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 110 (1): 48–55. doi:10.1590/0074-02760140097.

- Meier, Thomas, Alexander Krah, Peter J. Bond, Denys Pogoryelov, Kay Diederichs, and José D. Faraldo-Gómez. 2009. "Complete Ion-Coordination Structure in the Rotor Ring of Na⁺-Dependent F-ATP Synthases." *Journal of Molecular Biology* 391 (2): 498–507. doi:10.1016/j.jmb.2009.05.082.
- Méndez, M.B., A. Goñi, W. Ramirez, and R.R. Grau. 2012. "Sugar Inhibits the Production of the Toxins That Trigger Clostridial Gas Gangrene." *Microbial Pathogenesis* 52 (1): 85–91. doi:10.1016/j.micpath.2011.10.008.
- Mitchell, Gabriel, Eric Brouillette, David Lalonde Séguin, Ann-Elise Asselin, Christian Lebeau Jacob, and François Malouin. 2010. "A Role for Sigma Factor B in the Emergence of Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants and Elevated Biofilm Production Resulting from an Exposure to Aminoglycosides." *Microbial Pathogenesis* 48 (1): 18–27. doi:10.1016/j.micpath.2009.10.003.
- Mitchell, Gabriel, Alexandre Fugère, Karine Pépin Gaudreau, Eric Brouillette, Eric H Frost, André M Cantin, and François Malouin. 2013. "SigB Is a Dominant Regulator of Virulence in Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants." *PloS One* 8 (5): e65018. doi:10.1371/journal.pone.0065018.
- Mitchell, Gabriel, Mariza Gattuso, Gilles Grondin, Éric Marsault, Kamal Bouarab, and François Malouin. 2011a. "Tomatidine Inhibits Replication of Staphylococcus Aureus Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (5): 1937–45. doi:10.1128/AAC.01468-10.
- Mitchell, Gabriel, Gilles Grondin, Ginette Bilodeau, André M Cantin, and François Malouin. 2011. "Infection of Polarized Airway Epithelial Cells by Normal and Small-Colony Variant Strains of Staphylococcus Aureus Is Increased in Cells with Abnormal Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function and Is Influenced by NF-κB." *Infection and Immunity* 79 (9): 3541–51.

doi:10.1128/IAI.00078-11.

Mitchell, Gabriel, Myriame Lafrance, Simon Boulanger, David Lalonde Séguin, Isabelle Guay, Mariza Gattuso, Eric Marsault, Kamal Bouarab, and François Malouin. 2012. “Tomatidine Acts in Synergy with Aminoglycoside Antibiotics against Multiresistant *Staphylococcus Aureus* and Prevents Virulence Gene Expression.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (3): 559–68.

doi:10.1093/jac/dkr510.

Mitchell, Gabriel, Charles-Antoine Lamontagne, Eric Brouillette, Gilles Grondin, Brian G Talbot, Michel Grandbois, and François Malouin. 2008. “*Staphylococcus Aureus* SigB Activity Promotes a Strong Fibronectin-Bacterium Interaction Which May Sustain Host Tissue Colonization by Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients.” *Molecular Microbiology* 70 (6): 1540–55. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06511.x.

Mitchell, Gabriel, David Lalonde Séguin, Ann-Elise Asselin, Eric Déziel, André M Cantin, Eric H Frost, Sophie Michaud, and François Malouin. 2010. “*Staphylococcus Aureus* Sigma B-Dependent Emergence of Small-Colony Variants and Biofilm Production Following Exposure to *Pseudomonas Aeruginosa* 4-Hydroxy-2-Heptylquinoline-N-Oxide.” *BMC Microbiology* 10 (January): 33. doi:10.1186/1471-2180-10-33.

Mitchell, Peter. 1961. “Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism.” *Nature* 191 (4784). Nature Publishing Group: 144–48. doi:10.1038/191144a0.

Mitome, N., T. Suzuki, S. Hayashi, and M. Yoshida. 2004. “Thermophilic ATP Synthase Has a Decamer c-Ring: Indication of Noninteger 10:3 H⁺/ATP Ratio and Permissive Elastic Coupling.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (33): 12159–64. doi:10.1073/pnas.0403545101.

- Moisan, H., E. Brouillette, C. L. Jacob, P. Langlois-Begin, S. Michaud, and F. Malouin. 2006. "Transcription of Virulence Factors in *Staphylococcus Aureus* Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients Is Influenced by SigB." *Journal of Bacteriology* 188 (1): 64–76. doi:10.1128/JB.188.1.64-76.2006.
- Moreillon, P. 2008. "New and Emerging Treatment of *Staphylococcus Aureus* Infections in the Hospital Setting." *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 14 Suppl 3 (April): 32–41. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.01961.x.
- Moreno, M S, B L Schneider, R R Maile, W Weyler, and M H Saier. 2001. "Catabolite Repression Mediated by the CcpA Protein in *Bacillus Subtilis*: Novel Modes of Regulation Revealed by Whole-Genome Analyses." *Molecular Microbiology* 39 (5): 1366–81.
- Nakanishi-Matsui, Mayumi, Mizuki Sekiya, and Masamitsu Futai. 2016. "ATP Synthase from *Escherichia Coli*: Mechanism of Rotational Catalysis, and Inhibition with the ϵ Subunit and Phytopolyphenols." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857 (2): 129–40. doi:10.1016/j.bbabbio.2015.11.005.
- Novick, Richard P. 2003. "Autoinduction and Signal Transduction in the Regulation of *Staphylococcal* Virulence." *Molecular Microbiology* 48 (6): 1429–49.
- Novick, Richard P, and Edward Geisinger. 2008. "Quorum Sensing in *Staphylococci*." *Annual Review of Genetics* 42 (January): 541–64. doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091640.
- Nuxoll, Austin S, Steven M Halouska, Marat R Sadykov, Mark L Hanke, Kenneth W Bayles, Tammy Kielian, Robert Powers, and Paul D Fey. 2012. "CcpA Regulates Arginine Biosynthesis in *Staphylococcus Aureus* through Repression of Proline

- Catabolism.” *PLoS Pathogens* 8 (11): e1003033. doi:10.1371/journal.ppat.1003033.
- O’Riordan, Katherine, and Jean C Lee. 2004. “Staphylococcus Aureus Capsular Polysaccharides.” *Clinical Microbiology Reviews* 17 (1): 218–34.
- Oberfeld, Benjamin, Josef Brunner, and Peter Dimroth. 2006. “Phospholipids Occupy the Internal Lumen of the c Ring of the ATP Synthase of Escherichia Coli.” *Biochemistry* 45 (6): 1841–51. doi:10.1021/bi052304+.
- Ohta, S, M Yohda, M Ishizuka, H Hirata, T Hamamoto, Y Otawara-Hamamoto, K Matsuda, and Y Kagawa. 1988. “Sequence and over-Expression of Subunits of Adenosine Triphosphate Synthase in Thermophilic Bacterium PS3.” *Biochimica et Biophysica Acta* 933 (1): 141–55.
- Onyango, Laura A., R. Hugh Dunstan, Johan Gottfries, Christof von Eiff, and Timothy K. Roberts. 2012. “Effect of Low Temperature on Growth and Ultra-Structure of Staphylococcus Spp.” Edited by Dipshikha Chakravorty. *PLoS ONE* 7 (1): e29031. doi:10.1371/journal.pone.0029031.
- Otto, T. D., G. P. Dillon, W. S. Degrave, and M. Berriman. 2011. “RATT: Rapid Annotation Transfer Tool.” *Nucleic Acids Research* 39 (9): e57–e57. doi:10.1093/nar/gkq1268.
- Pérez-Espinosa, A, T Roldán-Arjona, and M Ruiz-Rubio. 2001. “Pantothenate Synthetase from Fusarium Oxysporum F. Sp. Lycopersici Is Induced by Alpha-Tomatine.” *Molecular Genetics and Genomics* : MGG 265 (5): 922–29.
- Petrella, Stephanie, Emmanuelle Cambau, Aurelie Chauffour, Koen Andries, Vincent Jarlier, and Wladimir Sougakoff. 2006. “Genetic Basis for Natural and Acquired Resistance to the Diarylquinoline R207910 in Mycobacteria.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (8): 2853–56. doi:10.1128/AAC.00244-06.

- Pogoryelov, Denys, Adriana L Klyszejko, Ganna O Krasnoselska, Eva-Maria Heller, Vanessa Leone, Julian D Langer, Janet Vonck, Daniel J Müller, José D Faraldo-Gómez, and Thomas Meier. 2012. “Engineering Rotor Ring Stoichiometries in the ATP Synthase.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (25): E1599-608. doi:10.1073/pnas.1120027109.
- Preiss, L., J. D. Langer, O. Yildiz, L. Eckhardt-Strelau, J. E. G. Guillemont, A. Koul, and T. Meier. 2015. “Structure of the Mycobacterial ATP Synthase Fo Rotor Ring in Complex with the Anti-TB Drug Bedaquiline.” *Science Advances* 1 (4): e1500106–e1500106. doi:10.1126/sciadv.1500106.
- Preiss, Laura, Julian D Langer, David B Hicks, Jun Liu, Ozkan Yildiz, Terry A Krulwich, and Thomas Meier. 2014. “The c-Ring Ion Binding Site of the ATP Synthase from *Bacillus Pseudofirmus* OF4 Is Adapted to Alkaliphilic Lifestyle.” *Molecular Microbiology* 92 (5): 973–84. doi:10.1111/mmi.12605.
- Preiss, Laura, Özkan Yildiz, David B. Hicks, Terry A. Krulwich, Thomas Meier, W Junge, H Sielaff, et al. 2010. “A New Type of Proton Coordination in an F1Fo-ATP Synthase Rotor Ring.” Edited by John Kuriyan. *PLoS Biology* 8 (8). Public Library of Science: e1000443. doi:10.1371/journal.pbio.1000443.
- Proctor, Richard A., Christof von Eiff, Barbara C. Kahl, Karsten Becker, Peter McNamara, Mathias Herrmann, and Georg Peters. 2006a. “Small Colony Variants: A Pathogenic Form of Bacteria That Facilitates Persistent and Recurrent Infections.” *Nature Reviews Microbiology* 4 (4): 295–305. doi:10.1038/nrmicro1384.
- Proctor, Richard A, Christof von Eiff, Barbara C Kahl, Karsten Becker, Peter McNamara, Mathias Herrmann, and Georg Peters. 2006b. “Small Colony Variants: A Pathogenic Form of Bacteria That Facilitates Persistent and Recurrent Infections.” *Nature Reviews. Microbiology* 4 (4): 295–305. doi:10.1038/nrmicro1384.

- Rao, S. P. S., S. Alonso, L. Rand, T. Dick, and K. Pethe. 2008. "The Protonmotive Force Is Required for Maintaining ATP Homeostasis and Viability of Hypoxic, Nonreplicating Mycobacterium Tuberculosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (33): 11945–50. doi:10.1073/pnas.0711697105.
- Sabra, W, A M Haddad, and A-P Zeng. 2014. "Comparative Physiological Study of the Wild Type and the Small Colony Variant of Pseudomonas Aeruginosa 20265 under Controlled Growth Conditions." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 30 (3): 1027–36. doi:10.1007/s11274-013-1521-z.
- Saier, M H. 1991. "A Multiplicity of Potential Carbon Catabolite Repression Mechanisms in Prokaryotic and Eukaryotic Microorganisms." *The New Biologist* 3 (12): 1137–47.
- Saier, M H, S Chauvaux, J Deutscher, J Reizer, and J J Ye. 1995. "Protein Phosphorylation and Regulation of Carbon Metabolism in Gram-Negative versus Gram-Positive Bacteria." *Trends in Biochemical Sciences* 20 (7): 267–71.
- Sambongi, Yoshihiro, Yuko Iko, Mikio Tanabe, Hiroshi Omote, Atsuko Iwamoto-Kihara, Ikuo Ueda, Toshio Yanagida, Yoh Wada, and Masamitsu Futai. 1999. "Mechanical Rotation of the c Subunit Oligomer in ATP Synthase (F₀F₁): Direct Observation." *Science* 286 (5445).
- Santana, M, M S Ionescu, A Vertes, R Longin, F Kunst, A Danchin, and P Glaser. 1994. "Bacillus Subtilis F₀F₁ ATPase: DNA Sequence of the Atp Operon and Characterization of Atp Mutants." *Journal of Bacteriology* 176 (22): 6802–11.
- Santos, Victor, and Irvin Hirshfield. 2016. "The Physiological and Molecular Characterization of a Small Colony Variant of Escherichia Coli and Its Phenotypic Rescue." *PloS One* 11 (6): e0157578. doi:10.1371/journal.pone.0157578.

- Schumacher, Maria A, Gerald Seidel, Wolfgang Hillen, and Richard G Brennan. 2007. "Structural Mechanism for the Fine-Tuning of CcpA Function by the Small Molecule Effectors Glucose 6-Phosphate and Fructose 1,6-Bisphosphate." *Journal of Molecular Biology* 368 (4): 1042–50. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.054.
- Schumacher, Maria A, Mareen Sprehe, Maike Bartholomae, Wolfgang Hillen, and Richard G Brennan. 2011. "Structures of Carbon Catabolite Protein A-(HPr-Ser46-P) Bound to Diverse Catabolite Response Element Sites Reveal the Basis for High-Affinity Binding to Degenerate DNA Operators." *Nucleic Acids Research* 39 (7): 2931–42. doi:10.1093/nar/gkq1177.
- Segala, Elena, Wladimir Sougakoff, Aurelie Nevejans-Chauffour, Vincent Jarlier, and Stephanie Petrella. 2012. "New Mutations in the Mycobacterial ATP Synthase: New Insights into the Binding of the Diarylquinoline TMC207 to the ATP Synthase C-Ring Structure." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56 (5): 2326–34. doi:10.1128/AAC.06154-11.
- Seggewiss, Jochen, Karsten Becker, Oliver Kotte, Martin Eisenacher, Mohammad Reza Khoschkhoy Yazdi, Andreas Fischer, Peter McNamara, et al. 2006. "Reporter Metabolite Analysis of Transcriptional Profiles of a Staphylococcus Aureus Strain with Normal Phenotype and Its Isogenic hemB Mutant Displaying the Small-Colony-Variant Phenotype." *Journal of Bacteriology* 188 (22): 7765–77. doi:10.1128/JB.00774-06.
- Seidel, Gerald, Marco Diel, Norbert Fuchsbauer, and Wolfgang Hillen. 2005. "Quantitative Interdependence of Coeffectors, CcpA and Cre in Carbon Catabolite Regulation of Bacillus Subtilis." *FEBS Journal* 272 (10). Blackwell Science Ltd: 2566–77. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04682.x.
- Seidl, Kati, Markus Bischoff, and Brigitte Berger-Bächi. 2008. "CcpA Mediates the

Catabolite Repression of Tst in *Staphylococcus Aureus*.” *Infection and Immunity* 76 (11): 5093–99. doi:10.1128/IAI.00724-08.

Seidl, Kati, Christiane Goerke, Christiane Wolz, Dietrich Mack, Brigitte Berger-Bächi, and Markus Bischoff. 2008. “*Staphylococcus Aureus* CcpA Affects Biofilm Formation.” *Infection and Immunity* 76 (5): 2044–50. doi:10.1128/IAI.00035-08.

Seidl, Kati, Susanne Müller, Patrice François, Carsten Kriebitzsch, Jacques Schrenzel, Susanne Engelmann, Markus Bischoff, and Brigitte Berger-Bächi. 2009. “Effect of a Glucose Impulse on the CcpA Regulon in *Staphylococcus Aureus*.” *BMC Microbiology* 9 (January): 95. doi:10.1186/1471-2180-9-95.

Seidl, Kati, Martin Stucki, Martin Ruegg, Christiane Goerke, Christiane Wolz, Llinos Harris, Brigitte Berger-Bächi, and Markus Bischoff. 2006. “*Staphylococcus Aureus* CcpA Affects Virulence Determinant Production and Antibiotic Resistance.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (4): 1183–94. doi:10.1128/AAC.50.4.1183-1194.2006.

Sendi, Parham, and Richard A Proctor. 2009. “*Staphylococcus Aureus* as an Intracellular Pathogen: The Role of Small Colony Variants.” *Trends in Microbiology* 17 (2): 54–58. doi:10.1016/j.tim.2008.11.004.

Silver, Lynn L. 2011. “Challenges of Antibacterial Discovery.” *Clinical Microbiology Reviews* 24 (1): 71–109. doi:10.1128/CMR.00030-10.

Singh, Kalpana D, Matthias H Schmalisch, Jörg Stülke, and Boris Görke. 2008. “Carbon Catabolite Repression in *Bacillus Subtilis*: Quantitative Analysis of Repression Exerted by Different Carbon Sources.” *Journal of Bacteriology* 190 (21). American Society for Microbiology (ASM): 7275–84. doi:10.1128/JB.00848-08.

Singh, Rachna, Pallab Ray, Anindita Das, and Meera Sharma. 2009. “Role of Persisters

and Small-Colony Variants in Antibiotic Resistance of Planktonic and Biofilm-Associated *Staphylococcus Aureus*: An in Vitro Study.” *Journal of Medical Microbiology* 58 (Pt 8): 1067–73. doi:10.1099/jmm.0.009720-0.

Somerville, Greg A, and Richard A Proctor. 2009. “At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in *Staphylococci*.” *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR* 73 (2): 233–48. doi:10.1128/MMBR.00005-09.

Sonenshein, Abraham L. 2007. “Control of Key Metabolic Intersections in *Bacillus Subtilis*.” *Nature Reviews. Microbiology* 5 (12). Nature Publishing Group: 917–27. doi:10.1038/nrmicro1772.

Stanley, Nicola R, Robert A Britton, Alan D Grossman, and Beth A Lazazzera. 2003. “Identification of Catabolite Repression as a Physiological Regulator of Biofilm Formation by *Bacillus Subtilis* by Use of DNA Microarrays.” *Journal of Bacteriology* 185 (6): 1951–57.

Stock, Daniela, Andrew G. W. Leslie, and John E. Walker. 1999. “Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase.” *Science* 286 (5445).

Talbot, George H, John Bradley, John E Edwards, David Gilbert, Michael Scheld, and John G Bartlett. 2006. “Bad Bugs Need Drugs: An Update on the Development Pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America.” *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 42 (5): 657–68. doi:10.1086/499819.

Tassew, Haimanot, Alemseged Abdissa, Getenet Beyene, and Solomon Gebre-Selassie. 2010. “Microbial Flora and Food Borne Pathogens on Minced Meat and Their Susceptibility to Antimicrobial Agents.” *Ethiopian Journal of Health Sciences* 20 (3): 137–43.

- Tobisch, S, D Zühlke, J Bernhardt, J Stülke, and M Hecker. 1999. “Role of CcpA in Regulation of the Central Pathways of Carbon Catabolism in *Bacillus Subtilis*.” *Journal of Bacteriology* 181 (22): 6996–7004.
- Tran, S. L., and G. M. Cook. 2005. “The F1Fo-ATP Synthase of *Mycobacterium Smegmatis* Is Essential for Growth.” *Journal of Bacteriology* 187 (14): 5023–28. doi:10.1128/JB.187.14.5023-5028.2005.
- Tuchscherr, Lorena, Eva Medina, Muzaffar Hussain, Wolfgang Völker, Vanessa Heitmann, Silke Niemann, Dirk Holzinger, et al. 2011. “*Staphylococcus Aureus* Phenotype Switching: An Effective Bacterial Strategy to Escape Host Immune Response and Establish a Chronic Infection.” *EMBO Molecular Medicine* 3 (3): 129–41. doi:10.1002/emmm.201000115.
- van der Voort, Menno, Oscar P Kuipers, Girbe Buist, Willem M de Vos, and Tjakko Abee. 2008. “Assessment of CcpA-Mediated Catabolite Control of Gene Expression in *Bacillus Cereus* ATCC 14579.” *BMC Microbiology* 8 (1): 62. doi:10.1186/1471-2180-8-62.
- Varga, J., V. L. Stirewalt, and S. B. Melville. 2004. “The CcpA Protein Is Necessary for Efficient Sporulation and Enterotoxin Gene (*Cpe*) Regulation in *Clostridium Perfringens*.” *Journal of Bacteriology* 186 (16): 5221–29. doi:10.1128/JB.186.16.5221-5229.2004.
- Varga, John J, Blair Therit, and Stephen B Melville. 2008. “Type IV Pili and the CcpA Protein Are Needed for Maximal Biofilm Formation by the Gram-Positive Anaerobic Pathogen *Clostridium Perfringens*.” *Infection and Immunity* 76 (11). American Society for Microbiology (ASM): 4944–51. doi:10.1128/IAI.00692-08.
- Vázquez-Boland, J A, M Kuhn, P Berche, T Chakraborty, G Domínguez-Bernal, W Goebel, B González-Zorn, J Wehland, and J Kreft. 2001. “*Listeria* Pathogenesis and

- Molecular Virulence Determinants.” *Clinical Microbiology Reviews* 14 (3): 584–640. doi:10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
- von Ballmoos, Christoph, Gregory M Cook, and Peter Dimroth. 2008. “Unique Rotary ATP Synthase and Its Biological Diversity.” *Annual Review of Biophysics* 37 (January): 43–64. doi:10.1146/annurev.biophys.37.032807.130018.
- von Ballmoos, Christoph, Alexander Wiedenmann, and Peter Dimroth. 2009. “Essentials for ATP Synthesis by F1F0 ATP Synthases.” *Annual Review of Biochemistry* 78 (January): 649–72. doi:10.1146/annurev.biochem.78.081307.104803.
- von Meyenburg, K, B B Jørgensen, J Nielsen, and F G Hansen. 1982. “Promoters of the Atp Operon Coding for the Membrane-Bound ATP Synthase of Escherichia Coli Mapped by Tn10 Insertion Mutations.” *Molecular & General Genetics : MGG* 188 (2): 240–48.
- Walker, J E, N J Gay, M Saraste, and A N Eberle. 1984. “DNA Sequence around the Escherichia Coli Unc Operon. Completion of the Sequence of a 17 Kilobase Segment Containing asnA, oriC, Unc, glmS and phoS.” *The Biochemical Journal* 224 (3). Portland Press Ltd: 799–815.
- Walker, John E. 2013. “The ATP Synthase: The Understood, the Uncertain and the Unknown.” *Biochemical Society Transactions* 41 (1).
- Watt, I. N., M. G. Montgomery, M. J. Runswick, A. G. W. Leslie, and J. E. Walker. 2010. “Bioenergetic Cost of Making an Adenosine Triphosphate Molecule in Animal Mitochondria.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (39): 16823–27. doi:10.1073/pnas.1011099107.
- Wolter, Daniel J, Julia C Emerson, Sharon McNamara, Anne M Buccat, Xuan Qin, Elizabeth Cochrane, Laura S Houston, et al. 2013. “Staphylococcus Aureus Small-

Colony Variants Are Independently Associated with Worse Lung Disease in Children with Cystic Fibrosis.” *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 57 (3): 384–91. doi:10.1093/cid/cit270.

Woodford, N, and M J Ellington. 2007. “The Emergence of Antibiotic Resistance by Mutation.” *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13 (1): 5–18. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01492.x.

Yagi, Hiromasa, Nobumoto Kajiwar, Hideaki Tanaka, Tomitake Tsukihara, Yasuyuki Kato-Yamada, Masasuke Yoshida, and Hideo Akutsu. 2007. “Structures of the Thermophilic F1-ATPase Epsilon Subunit Suggesting ATP-Regulated Arm Motion of Its C-Terminal Domain in F1.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (27). National Academy of Sciences: 11233–38. doi:10.1073/pnas.0701045104.

Yarwood, Jeremy M, and Patrick M Schlievert. 2003. “Quorum Sensing in Staphylococcus Infections.” *The Journal of Clinical Investigation* 112 (11). American Society for Clinical Investigation: 1620–25. doi:10.1172/JCI20442.

Yasbin, R E, and F E Young. 1974. “Transduction in Bacillus Subtilis by Bacteriophage SPP1.” *Journal of Virology* 14 (6). American Society for Microbiology (ASM): 1343–48.

Zomer, A. L., G. Buist, R. Larsen, J. Kok, and O. P. Kuipers. 2007. “Time-Resolved Determination of the CcpA Regulon of Lactococcus Lactis Subsp. Cremoris MG1363.” *Journal of Bacteriology* 189 (4): 1366–81. doi:10.1128/JB.01013-06.

